

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CAROLINA GIACOMELLI VARGAS

RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS A PARTIR DO RESÍDUO
HIDRODESTILADO DE ALECRIM: EXTRAÇÃO E EFEITO ANTITUMORAL NA
LINHAGEM DE MELANOMA CUTÂNEO A375

PALOTINA

2026

ANA CAROLINA GIACOMELLI VARGAS

RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS A PARTIR DO RESÍDUO
HIDRODESTILADO DE ALECRIM: EXTRAÇÃO E EFEITO ANTITUMORAL NA
LINHAGEM DE MELANOMA CUTÂNEO A375

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia Ambiental, Setor de Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Joel Gustavo Teleken

Coorientador: Prof. Dr. João Paulo Bender

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli

PALOTINA

2026

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.
Biblioteca UFPR Palotina.

V297 Vargas, Ana Carolina Giacomelli

Recuperação de compostos fenólicos a partir do resíduo hidrodestilado de alecrim: extração e efeito antitumoral na linhagem de melanoma cutâneo A375 / Ana Carolina Giacomelli Vargas. – Palotina, PR, 2026.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Joel Gustavo Teleken.

Coorientador: Prof. Dr. João Paulo Bender.

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli.

1. *Bacillus spp.* 2. Fitopatógenos. 3. Surfactina.
I. Teleken, Joel Gustavo. II. Bender, João Paulo.
III. Mibielli, Guilherme Martinez. IV. Universidade Federal do Paraná. VI. Título.

CDU 62



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA E
TECNOLOGIA AMBIENTAL - 40001016173P5

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANA CAROLINA GIACOMELLI VARGAS**, intitulada: **Recuperação de compostos fenólicos a partir do resíduo hidrodestilado de alecrim: extração e efeito antitumoral na linhagem de melanoma cutâneo A375**, sob orientação do Prof. Dr. JOEL GUSTAVO TELEKEN, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Palotina, 19 de Fevereiro de 2026.

Assinatura Eletrônica

19/02/2026 19:20:05.0

JOEL GUSTAVO TELEKEN

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

19/02/2026 19:55:44.0

SÉRGIO LUIZ ALVES JÚNIOR

Avaliador Externo (UFFS - UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL)

Assinatura Eletrônica

20/02/2026 12:04:12.0

MARGARETE DULCE BAGATINI

Avaliador Externo (55002856)

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Meu muito obrigado ao meu orientador, Dr. Joel Gustavo Teleken, e aos meus coorientadores, Dr. João Paulo Bender e Dr. Guilherme Mibielli pela orientação ao longo de toda a pesquisa.

Agradeço também aos membros da banca examinadora, Dr. Sérgio Luiz Alves e Dra. Margarete Bagatini, pelo apoio e pelas valiosas contribuições. Agradeço a parceria entre a Universidade Federal do Paraná e a Universidade Federal da Fronteira Sul, e aos laboratórios de Resíduos Sólidos (LABRES) e de Cultivo e Estudos Celulares e Moleculares (LABCELL), essenciais para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradeço aos amigos e colegas pesquisadores que estiveram ao meu lado nessa trajetória, especialmente Aline Dresch, Bruna Santos, Daiane Manica, Gilnei Silva, Odinei Fogolari, Rodrigo Rodrigues e Gustavo Bloemer pela colaboração.

Agradeço ao meu parceiro de vida Fábio Júnior Bet por todo o suporte de sempre.

Por fim, agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina) pelo apoio a pós-graduação e pelo suporte financeiro.

RESUMO

Resíduo sólido de hidrodestilação do alecrim, um subproduto da indústria de óleos essenciais, representa uma importante fonte de bioativos fenólicos. No atual cenário em que o câncer permanece entre as principais causas de mortalidade global e que as terapias convencionais ainda apresentam eficácia limitada, a busca por estratégias complementares baseadas em fitoquímicos provenientes de plantas medicinais são intensificadas. Nesse contexto, este estudo investigou o potencial biológico de extratos etanólicos obtidos do resíduo de alecrim pós-hidrodestilação em células de melanoma cutâneo A375. A hidrodestilação apresentou rendimento aproximado de 2 mL/100 g em 30 minutos, e a comparação entre hidrodestilações de 30 minutos e 4 horas revelou que o perfil volátil permanece amplamente estável. A extração assistida por ultrassom, conduzida por meio de um planejamento fatorial 2³, demonstrou elevada eficiência na recuperação de compostos fenólicos não voláteis, especialmente nas condições do ensaio 5, em que a temperatura e a concentração de etanol se destacaram como variáveis de maior influência. A análise fenólica mostrou compostos como ácido gálico, ácido p-cumárico e ácido rosmarínico, além da vanilina, que foi preservada devido ao tempo reduzido de tratamento térmico. O extrato apresentou ação pró-oxidante e expressiva atividade citotóxica frente à linhagem de melanoma A375, promovendo redução significativa na viabilidade celular e no potencial transmembranar das mitocôndrias. Efeitos significativos foram observados a partir da concentração de 0,05 mg/mL no ensaio de MTT e a partir da concentração 0,1 mg/mL com os ensaios de fluorescência com DAPI e TMRE. Além disso, os extratos provocaram morte celular em todo o meio de forma significativa no ensaio de migração celular a partir de 0,1 mg/mL, utilizando o ensaio de cicatrização de feridas. O extrato aumentou as espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir da concentração de 0,2 mg/mL e diminuiu os níveis dos marcadores antioxidantes PSH e NPSH a partir de concentrações de 0,05 mg/mL, evidenciando o aumento do estresse oxidativo. Em conjunto, os resultados demonstram que o resíduo de alecrim constitui uma fonte promissora de compostos bioativos, reforçando seu potencial para aplicações terapêuticas e contribuindo tanto para a redução dos custos associados ao desenvolvimento de fitoquímicos na oncologia quanto para a valorização sustentável de resíduos.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis L*; resíduo etanólico de alecrim; extração assistida por ultrassom; melanoma cutâneo A375.

ABSTRACT

Solid residue from rosemary hydrodistillation, a by-product of the essential oil industry, represent an important source of phenolic bioactive compounds. In the current scenario, in which cancer remains among the leading causes of global mortality and conventional therapies still show limited efficacy, the search for complementary strategies based on phytochemicals derived from medicinal plants has intensified. In this context, this study investigated the biological potential of ethanolic extracts obtained from post-hydrodistillation rosemary residues in A375 cutaneous melanoma cells. Hydrodistillation yielded approximately 2 mL/100 g in 30 minutes, and the comparison between 30-minute and 4-hour hydrodistillation processes revealed that the volatile profile remained largely stable. Ultrasound-assisted extraction, conducted using a 2³ factorial design, demonstrated high efficiency in the recovery of non-volatile phenolic compounds, particularly under the conditions of assay 5, in which temperature and ethanol concentration stood out as the most influential variables. Phenolic analysis revealed compounds such as gallic acid, p-coumaric acid, and rosmarinic acid, as well as vanillin, which was preserved due to the reduced duration of thermal treatment. The extract exhibited pro-oxidant action and significant cytotoxic activity against the A375 melanoma cell line, promoting a marked reduction in cell viability and in the mitochondrial transmembrane potential. Significant effects were observed from the concentration of 0.05 mg/mL in the MTT assay and from 0.1 mg/mL in the fluorescence assays using DAPI and TMRE. In addition, the extracts induced apoptosis throughout the medium in the cell migration assay at concentrations starting from 0.1 mg/mL, using the wound-healing assay. The extract increased reactive oxygen species (ROS) observed from the concentration of 0.2 mg/mL and decreased the levels of the antioxidant markers PSH and NPSH from concentrations of 0.05 mg/mL, indicating an increase in oxidative stress. Taken together, the results demonstrate that rosemary residue is a promising source of bioactive compounds, reinforcing its potential for therapeutic applications and contributing both to reducing the costs associated with the development of phytochemicals in oncology and to the sustainable valorization of residues.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* L.; rosemary ethanolic residue; ultrasound-assisted extraction; A375 cutaneous melanoma.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PUBLICAÇÕES RESULTANTES DA BUSCA NA BASE DE DADOS LENS.ORG.....	19
FIGURA 2 - IMAGENS DO ALECRIM (<i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i>).....	20
FIGURA 3 - SUBPRODUTOS PROVENIENTES DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	22
FIGURA 4 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS MECANISMOS ATUANTES NA EXTRAÇÃO POR MICRO-ONDAS	22
FIGURA 5 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO DE LÍQUIDO PRESSURIZADO E SEU FUNCIONAMENTO.....	35
FIGURA 6 - PRINCIPAIS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM	25
FIGURA 7 - PRINCIPAIS COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS DO EXTRATO DE ALECRIM	25
FIGURA 8 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS POR MEIO DE HIDRODIFUSÃO POR MICRO-ONDAS A GRAVIDADE	27
FIGURA 9 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR MEIO DA MACERAÇÃO.....	28
FIGURA 10 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR MEIO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	29
FIGURA 11 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR MEIO DA EXTRAÇÃO POR SOXHLET.....	30

FIGURA 12 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS MECANISMOS ATUANTES NA EXTRAÇÃO POR MICRO-ONDAS	32
FIGURA 13 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO DE LÍQUIDO PRESSURIZADO E SEU FUNCIONAMENTO.....	34
FIGURA 14 - PRINCIPAIS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM	47
FIGURA 15 - PRINCIPAIS COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM	48
FIGURA 16 - FLUXOGRAMA DE ORGANIZAÇÃO E HIERARQUIA DAS ATIVIDADES REALIZADAS NO ESTUDO	61
FIGURA 17 - AMOSTRAS DE ALECRIM UTILIZADAS	62
FIGURA 18 - PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL EM DESTILADOR CLEVINGER ACOPLADO A CHILLER.....	62
FIGURA 19 - RENDIMENTOS DOS ENSAIOS PRELIMINARES EM CLEVINGER	70
FIGURA 20 – VALORES PREDITOS E VALORES OBSERVADOS PARA CFT E AAT	76
FIGURA 21 - EFEITO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES NO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL (CFT).....	79
FIGURA 22 - EFEITO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES NA ATIVIDADE ATIOXIDANTE TOTAL (AAT).....	490
FIGURA 23 - VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM CELULAR A375 APÓS 24 HORAS DE TRATAMENTO COM EXTRATO DE ALECRIM.....	85
FIGURA 24 - ENSAIO DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA PARA VIABILIDADE CELULAR POR COLORAÇÃO DAPI E POTENCIAL TRANSMEMBRANAR DAS MITOCÔNDRIAS POR COLORAÇÃO TMRE	86

FIGURA 25 - MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA APÓS 24 HORAS DE TRATAMENTO COM EXTRATO DO RESÍDUO DE ALECRIM	87
FIGURA 26 - DETERMINAÇÃO DO PERFIL REDOX (ROS, NO _x , PSH e NPSH) NAS CÉLULAS DE MELANOMA CUTÂNEO	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE ALECRIM POR MEIO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE HIDRODESTILAÇÃO (HD), DESTILAÇÃO POR ARRASTE DE VAPOR (SD) E HIDRODIFUSÃO POR MICRO-ONDAS E GRAVIDADE (MHG)	37
TABELA 2 – CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE ALECRIM POR MEIO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE EXTRAÇÃO COM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SFE), EXTRAÇÃO POR LÍQUIDO PRESSURIZADO (PLE), EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (UAE), EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS (MAE) E EXTRAÇÃO SOXHLET (SE)	40
TABELA 3 – PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³ APLICADO NA EXTRAÇÃO POR ULTRASSOM).....	64
TABELA 4 – COMPOSIÇÃO PRELIMINAR DO PERFIL VOLÁTIL DO ALECRIM SUBMETIDO A 30 MINUTOS E 4 HORAS DE EXTRAÇÃO EM HIDRODESTILADOR	70
TABELA 5 – COMPOSIÇÃO DEFINITIVA DO PERFIL VOLÁTIL DO ALECRIM SUBMETIDO A 30 MINUTOS DE EXTRAÇÃO EM HIDRODESTILADO	72
TABELA 6 – CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL (CFT) E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT) SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO, CONFORME O DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	74
TABELA 7 – ANOVA CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL (CFT).....	76
TABELA 8 – ANOVA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT).....	76
TABELA 9 – COMPOSIÇÃO DO PERFIL NÃO VOLÁTIL DO RESÍDUO HIDRODESTILADO DO ALECRIM SUBMETIDO AO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ASSISTIDO POR ULTRASSOM	81

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE ALECRIM POR MEIO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE EXTRAÇÃO COM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SFE), EXTRAÇÃO POR LÍQUIDO PRESSURIZADO (PLE), EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (UAE), EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS (MAE) E EXTRAÇÃO SOXHLET (SE)	27
QUADRO 2 – COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS.....	35
QUADRO 3 – COMPARAÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS DO ALECRIM E SUAS AÇÕES ANTICANCERÍGENAS	53
QUADRO 4 – ANÁLISE E COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA PERFIL FENÓLICO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	59

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AAPH	- Dicloridrato de 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina)
AGE	- Ácido gálico equivalente
AAT	- Atividade antioxidante total
CFT	- Conteúdo Fenólico Total
DAPI	- 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DPPH	- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTNB	- 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
FC	- Folin-Ciocalteu
Fe ³⁺ -TPTZ	- Complexo férrico de tripiridiltriiazina
FRAP	- Poder antioxidante redutor férrico
GC	- Cromatografia gasosa
GC-MS	- Cromatografia gasosa-espectrometria de massa
GHz	- Gigahertz
HD	- Hidrodestilação
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência
m/z	- Razão massa/carga
MAE	- Extração assistida por micro-ondas
MHG	- Hidrodifusão por micro-ondas e a gravidade
MHz	- Mega-hertz
MS	- Detector de massa sequencial
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio)
NED	- N-1-naftiletilenodiamino-bicloridrato
NO _x	- Óxido nítrico
NPSH	- Tióis não proteicos
ORAC	- Capacidade de absorção de radicais de oxigênio
PBS	- Tampão fosfato-salino
pH	- Potencial hidrogeniônico
PLE	- Extração por líquido pressurizado
PSH	- Tióis toais
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
RSL	- Razão sólido-líquido

SD	- Destilação a vapor
SE	- Extração Soxhlet
SFE	- Extração com fluido supercrítico
TCA	- Ácido tricloroacético
TE	- Trolox equivalente
TMRE	- Éster etílico de tetrametilrodamina
UAE	- Extração assistida por ultrassom
UV-B	- Radiação ultravioleta B

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- Porcentagem
/	- Divisão
°C	- Graus Celsius
g	- Gramas
mg	- Miligrama
kHz	- Quilo-hertz
kW	- Quilo-wAAT
min	- Minutos
nm	- Nanômetro
W	- WAAT
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
µmol	- Micromol
pH	- Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	18
2.1.1 Objetivo geral	18
2.1.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 ALECRIM (<i>ROSMARINUS OFFICINALIS L.</i>)	19
3.1.1 Cultivares e quimiotipos de alecrim	20
3.2 SUBPRODUTOS DA EXTRAÇÃO VOLÁTIL	21
3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS	23
3.3.1 Extração de compostos voláteis.....	24
3.3.1.1 Hidrodestilação.....	24
3.3.1.2 Destilação por arraste de vapor	25
3.3.1.3 Hidrodestilação assistida por micro-ondas.....	26
3.3.1.4 Hidrodifusão por micro-ondas a gravidade.....	27
3.3.2 Extração de compostos não voláteis	29
3.3.2.1 Maceração	29
3.3.2.2 Extração assistida por ultrassom	30
3.3.2.3 Extração por Soxhlet	31
3.3.2.4 Extração assistida por micro-ondas.....	32
3.3.2.5 Extração por líquido pressurizado.....	34
3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ALECRIM.....	36
3.4.1 Compostos voláteis.....	37
3.4.2 Compostos não voláteis	40
3.5 COMPOSTOS BIOATIVOS E SUAS AÇÕES ANTICANCERÍGENAS	47
3.5.1 Compostos voláteis e suas ações anticancerígenas.....	47
3.5.2 Compostos não voláteis e suas ações anticancerígenas.....	49
3.5.2.1 Ácido carnósico	50
3.5.2.2 Carnosol.....	50
3.5.2.3 Rosmanol.....	51
3.5.2.4 Ácido rosmarínico	51
3.5.2.5 Ácido cafeico.....	51
3.5.2.6 Ácido oleanólico.....	52

3.5.2.7	Ácido ursólico	53
3.5.2.8	Galocatequina.....	53
3.6	CENÁRIO ATUAL DO USO DE FITOQUÍMICOS NO TRATAMENTO DE CÂNCER	55
3.7	ANÁLISES DOS COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE ...	56
3.7.1	Método GC-MS - Perfil fenólico.....	57
3.7.2	Método HPLC-MS - Perfil fenólico	57
3.7.3	Método FC - Compostos fenólicos totais	58
3.7.4	Método DPPH - Capacidade antioxidante.....	58
3.7.5	Método FRAP - Capacidade antioxidante	59
3.7.6	Método ORAC - Capacidade antioxidante.....	59
4	MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.1	OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS DE ALECRIM.....	62
4.2	EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS	63
4.3	TESTES PRELIMINARES E DEFINIÇÃO DA AMOSTRA E CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO	64
4.4	EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DOS COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS...	65
4.5	DETERMINAÇÃO DO PERFIL VOLÁTIL DO ÓLEO ESSENCIAL.....	65
4.6	DETERMINAÇÃO DO PERFIL NÃO VOLÁTIL DO EXTRATO.....	66
4.7	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL	66
4.8	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	67
4.9	EVAPORAÇÃO DO ETANOL E LIOFILIZAÇÃO DO EXTRATO	67
4.10	ANÁLISES DO EFEITO ANTITUMORAL NA LINHAGEM DE MELANOMA CUTÂNEO A375	68
4.10.1	Cultivo celular e tratamento	68
4.10.2	Análise da viabilidade celular (MTT)	68
4.10.3	Ensaio de microscopia de fluorescência para viabilidade celular por coloração 4',6- diamidino-2-fenilindol (DAPI) e potencial transmembranar das mitocôndrias por coloração com éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE).....	69
4.10.4	Ensaio de migração celular.....	69
4.10.5	Perfil redox (ROS, NOx, PSH e NPSH).....	70
4.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	70
5	RESULTADOS	72

5.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA DE ALECRIM PARA UTILIZAÇÃO NA EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO	72
5.2 OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO NA EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO	72
5.3 COMPOSIÇÃO DO PERFIL VOLÁTIL DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM	75
5.4 CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL.....	78
5.4.1 Análise estatística conteúdo fenólico total e atividade antioxidante total	80
5.5 COMPOSIÇÃO DO PERFIL NÃO VOLÁTIL DO EXTRATO DE ALECRIM	85
5.6 EFEITO ANTITUMORAL NA LINHAGEM DE MELANOMA CUTÂNEO A375	87
5.6.1 Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	87
5.6.2 Ensaio de microscopia de fluorescência para viabilidade celular por coloração DAPI e potencial transmembranar das mitocôndrias por coloração TMRE	89
5.6.3 Ensaio de migração celular	90
5.6.4 Perfil Redox (ROS, NO _x , PSH e NPSH)	91
6 CONCLUSÃO.....	93
REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços no entendimento dos mecanismos subjacentes à progressão tumoral e no desenvolvimento de fármacos sintéticos, o câncer permanece entre as principais causas de mortalidade global, e a melhoria da sobrevida geral continua limitada (Choudhari et al., 2020). Entre os diversos tipos de câncer, o melanoma cutâneo se destaca como um dos cânceres mais comuns no mundo, originado pela transformação maligna e proliferação descontrolada de melanócitos. Com alto potencial metastático, apresenta taxa de sobrevivência em cinco anos inferior a 10% em pacientes com metástases, refletindo a resposta restrita às terapias convencionais, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Sorino et al., 2024; Lopes et al., 2022).

Entre as alternativas promissoras de estratégias complementares aos tratamentos convencionais do câncer, os fitoquímicos têm ganhado destaque, especialmente os compostos fenólicos amplamente encontrados em plantas (Choudhari et al., 2020). Um exemplo relevante é o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). Atualmente, seu óleo essencial é amplamente utilizado nas indústrias, entretanto, o resíduo sólido, um subproduto da extração, é frequentemente descartado, apesar de conter compostos fenólicos não voláteis (Wang et al., 2023; Tavares et al., 2022; D'Amato et al., 2018). Os compostos fenólicos não voláteis concentram ácidos fenólicos, diterpenos, triterpenos e flavonoides (Bouammali et al., 2023; Ali et al., 2019; Christopoulou et al., 2021), os quais demonstram propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagênicas e antiproliferativas, contribuindo para efeitos anticâncer e intensificando o interesse científico (Di Martile et al., 2020; Aziz et al., 2022; Petiwala e Johnson, 2015; Bouammali et al., 2023).

Ainda, o custo de desenvolvimento e produção na oncologia com fitoquímicos é tanto uma oportunidade para explorar como uma ameaça no potencial para altos custos e acesso restrito (Aljabali et al., 2025), dessa forma, a valorização desse resíduo pode oferecer benefícios econômicos, reduzir a carga poluente e promover a economia circular nas indústrias de óleos essenciais (Wang et al., 2023; Tavares et al., 2022; D'Amato et al., 2018).

O estudo alcançou morte celular da linhagem A375 com concentrações de ácido rosmarínico muito abaixo das relatadas pela literatura, indicando que o efeito foi pela sinergia dos compostos encontrados. Ainda, os resultados sugerem que resíduo hidrodestilado de alecrim possuem efeito pró-oxidante, no entanto os mecanismos subjacentes da indução da morte de células de melanoma permanecem desconhecidos.

2 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo geral

Esta proposta tem como objetivo valorizar integralmente o alecrim por meio da extração sequencial de compostos voláteis e não voláteis, com aproveitamento do resíduo sólido como fonte de metabólitos bioativos. Após a identificação e quantificação dos compostos obtidos, será investigado o potencial biológico da fração não volátil frente ao câncer de melanoma cutâneo humano, utilizando a linhagem A375 como modelo experimental, avaliando viabilidade celular, migração celular e marcadores associados ao estresse, correlacionando o perfil fitoquímico não volátil encontrado com os efeitos biológicos observados, a fim de demonstrar o potencial do resíduo hidrodestilado de alecrim como fonte de agentes antitumorais.

2.1.2 Objetivos específicos

Para atender o objetivo geral, pretende-se cumprir as seguintes etapas:

1. Realizar a extração dos compostos bioativos voláteis de *Rosmarinus officinalis*. por hidrodestilação, com ênfase na melhoria do rendimento do óleo essencial em função do tempo de extração.
2. Aproveitar o resíduo sólido proveniente da hidrodestilação para maximizar a recuperação de compostos bioativos não voláteis presentes no material vegetal, utilizando o método de extração assistida por ultrassom (UAE).
3. Proceder à quantificação e caracterização dos compostos bioativos voláteis e não voláteis obtidos.
4. Avaliar o potencial antitumoral dos compostos bioativos não voláteis, investigando seus efeitos sobre a viabilidade celular, migração celular e marcadores pró-oxidantes na linhagem de melanoma cutâneo humano A375.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ALECRIM (*ROSMARINUS OFFICINALIS L.*)

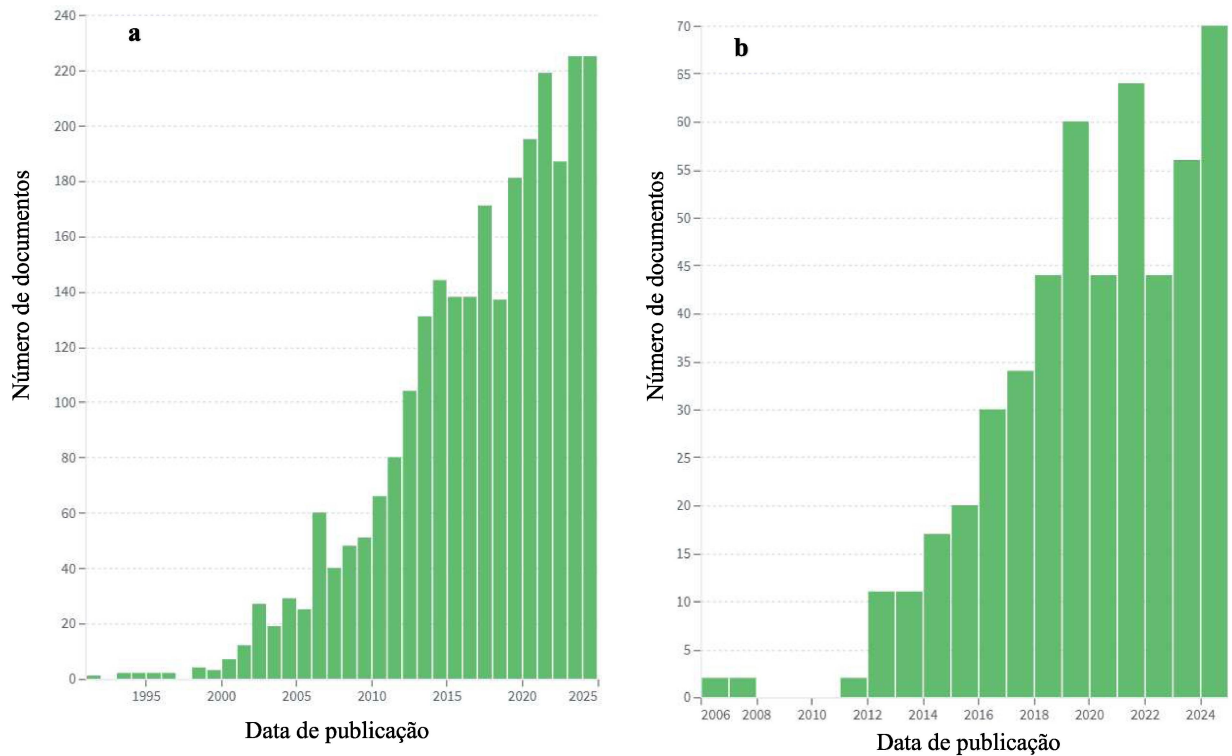
O alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) é uma planta aromática nativa da região do Mediterrâneo. Este arbusto perene, com altura variando entre 60 e 180 cm e diâmetro entre 60 e 150 cm, é caracterizado por suas folhas aromáticas que conferem sua fragrância distintiva. Devido à sua capacidade de adaptação a diversas condições de cultivo, o alecrim foi intencionalmente disseminado de sua região nativa para outras áreas, sendo amplamente utilizado como planta ornamental e medicinal (Aziz et al., 2022).

O alecrim possui uma longa história na medicina tradicional, destacando-se por seus potenciais benefícios à saúde, como ações antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória, que têm sido fundamentais nas práticas tradicionais de cura. Suas propriedades aromáticas e saborosas, fizeram do alecrim um elemento essencial nas tradições culinárias, enquanto seu significado cultural abrange rituais, cerimônias e festivais (Ayyildiz, Pelvan e Karadeniz, 2024).

Os óleos essenciais de alecrim são amplamente utilizados em diversas aplicações nas indústrias química, farmacêutica, alimentícia e de aromatizantes. Além de seu amplo uso industrial em conservantes, aromatizantes e fragrâncias, o extrato de alecrim destaca-se economicamente entre os antioxidantes de fontes naturais, tornando-se um dos antioxidantes naturais mais comercializados no mercado (Aziz et al., 2022).

Nos últimos anos, a pesquisa científica tem intensificado a avaliação dos potenciais benefícios do alecrim (*R. officinalis*) para a saúde, com um foco particular em sua atividade antioxidante e seu papel na prevenção do câncer. Esse crescente interesse é evidenciado pelo número significativo de publicações científicas, como apresentado no Gráfico 1, a busca na plataforma Lens.org utilizando as palavras-chave "rosmarinus" e "cancer" resultou em 2.822 artigos, dos quais 1.051 foram publicados nos últimos cinco anos (2020-2024), enquanto a combinação de "rosmarinus" "antioxidant" e "melanoma cells" gerou 538 resultados, dos quais 278 foram publicados no mesmo período. Esses dados destacam o aumento do interesse e da relevância das pesquisas sobre as propriedades antioxidantes e anticancerígenas do alecrim.

FIGURA 1 - PUBLICAÇÕES RESULTANTES DA BUSCA NA BASE DE DADOS LENS.ORG



a - palavras-chave: "rosmarinus" e "cancer". **b** - palavras-chave: "rosmarinus" "antioxidant" e "melanoma cells",

FONTE: Base de dados Lens.org, 2025.

3.1.1 Cultivares e quimiotipos de alecrim

O gênero do alecrim, *Rosmarinus*, inclui diversas espécies além da bem conhecida *Rosmarinus officinalis* (Figura 2), como *Rosmarinus eriocalyx* L, *Rosmarinus tomentosus* Hub.-Mor. & Maire e *Salvia rosmarinus* Spenn. Essas espécies se diferenciam por características físicas e perfis fitoquímicos específicos. No entanto, a maioria dos estudos fitoquímicos e farmacológicos tem se concentrado no *R. officinalis*, difundindo seu uso universal devido às suas propriedades amplamente reconhecidas (Bendif et al., 2017).

Os cultivares e quimiotipos do *R. officinalis* apresentam uma ampla gama de variações dentro da própria espécie, que afetam tanto as características físicas quanto a composição química das plantas (Hashemi et al., 2023). A quantidade, a composição e a proporção dos metabólitos são moduladas por uma série de fatores internos e externos, incluindo a idade da planta, às condições climáticas, o tipo de solo e as condições de estresse, os quais podem tanto inibir quanto estimular a síntese de compostos específicos (Borrás-Linares et al., 2014). Variações sutis no pH do solo e em sua composição podem alterar significativamente as vias

bioquímicas das plantas, influenciando os metabólitos produzidos, mesmo entre diferentes cultivares de alecrim (Borrás-Linares et al., 2014). Além disso, fatores como as condições de irrigação, o momento da colheita, as práticas de armazenamento, os tratamentos de secagem, o método de extração e o solvente utilizado também desempenham papéis cruciais na determinação da composição fenólica final dos extratos de alecrim (Mena et al., 2016).

FIGURA 2 - IMAGENS DO ALECRIM (*R. OFFICINALIS*)

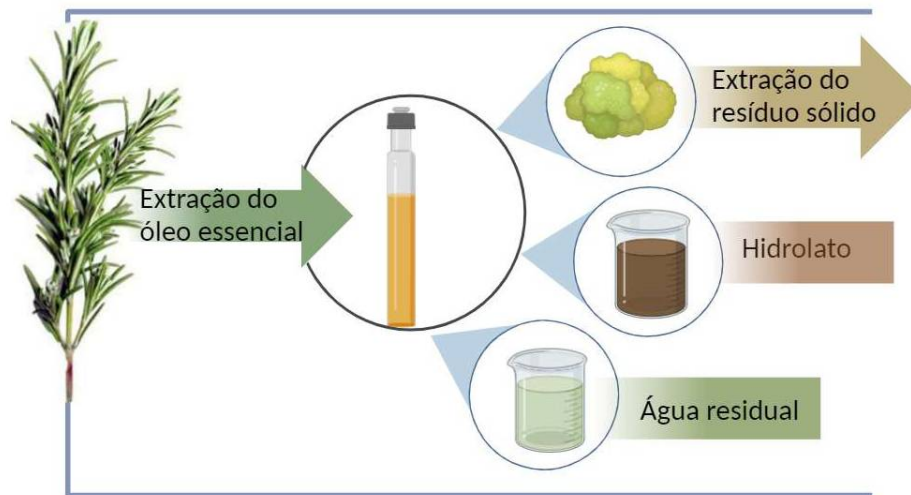


FONTE: A autora (2026).

3.2 SUBPRODUTOS DA EXTRAÇÃO VOLÁTIL

A extração de óleos essenciais de plantas aromáticas resulta na geração de subprodutos como o resíduo sólido, hidrolato e a água residual (Figura 3). Esses subprodutos frequentemente são descartados, o que pode causar impactos ambientais negativos. No entanto, há um crescente interesse em explorar o potencial de reutilização desses materiais, uma vez que eles contêm compostos bioativos valiosos, como fenólicos e antioxidantes. A valorização desses resíduos pode reduzir a carga poluente e oferecer benefícios econômicos adicionais, contribuindo para a sustentabilidade e promovendo a economia circular nas indústrias de óleos essenciais (Wang et al., 2023; Tavares et al., 2022; D'Amato et al., 2018).

FIGURA 3 - SUBPRODUTOS PROVENIENTES DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL



FONTE: A autora (2026).

O resíduo sólido resultante do processo de extração do óleo essencial é o material vegetal que permanece após a destilação. A composição química deste resíduo é influenciada pela técnica de extração, pois a lixiviação de compostos polares para as águas residuais pode ocorrer, especialmente em técnicas que envolvem destilação. Como resultado, o resíduo sólido tende a ser desprovido de compostos voláteis e fenólicos polares (De Elguea-Culebras, Bravo e Sánchez-Vioque, 2022). Embora não contenha quantidades significativas de fenóis totais, o resíduo sólido possui frações de fenóis apolares e outros compostos químicos de maior polaridade em concentrações elevadas.

Frequentemente, o resíduo sólido é processado adicionalmente para concentrar ou isolar seus compostos ativos. A extração prévia de óleos essenciais pode aumentar a taxa de transferência de massa de antioxidantes das folhas, tornando a utilização do resíduo sólido uma prática vantajosa para valorização e sustentabilidade dos recursos vegetais (De Elguea-Culebras, Bravo e Sánchez-Vioque, 2022; Navarrete et al., 2011).

Os hidrolatos são misturas complexas formadas durante o processo de destilação de óleos essenciais, contendo traços de óleos essenciais e uma gama de componentes solúveis em água que são extraídos dos constituintes do óleo durante a destilação (D'Amato et al., 2018). Quimicamente, os hidrolatos são uma mistura heterogênea que inclui água de condensação, componentes polares do óleo e metabólitos secundários voláteis que formam ligações de hidrogênio com a água (D'Amato et al., 2018; Tavares et al., 2022). Embora os hidrolatos compartilhem algumas semelhanças com a composição do óleo essencial correspondente, os principais componentes estão presentes em concentrações reduzidas. No entanto, alguns

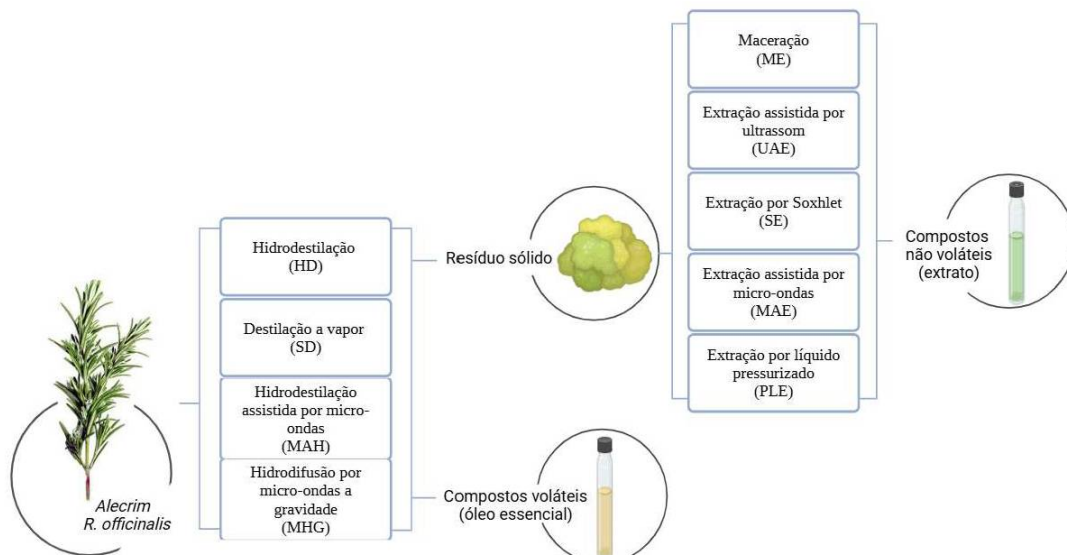
componentes solúveis em água, frequentemente aqueles que contêm oxigênio, estão presentes em concentrações mais altas nos hidrolatos em comparação com os óleos essenciais (Wang et al., 2023).

A água residual gerada durante a destilação, conhecida como fase aquosa da hidrodestilação (ou água residual de destilação) e da destilação a vapor (ou água de condensação), é geralmente descartada como efluente (De Elguea-Culebras, Bravo e Sánchez-Vioque, 2022; Tavares et al., 2022). No entanto, esta água residual ainda pode conter antioxidantes e outros compostos biologicamente ativos, incluindo metabólitos primários e secundários, bem como compostos voláteis ligados glicosidicamente, que podem ser explorados para usos adicionais (D'Amato et al., 2018; Tavares et al., 2022).

3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS

A análise das técnicas de extração dos compostos voláteis e não voláteis revela que a escolha do método pode influenciar significativamente a composição da fração bioativa obtida (Mena et al., 2016). As vantagens e desvantagens de cada método precisam ser ponderadas para determinar a técnica mais adequada para a recuperação eficiente dos compostos de interesse. Além disso, é essencial considerar o custo de implementação e operação de cada método, bem como seus impactos ambientais e aspectos de sustentabilidade. A Figura 4 ilustra as principais técnicas abordadas para a extração dos compostos voláteis e não voláteis do alecrim.

FIGURA 4 - PRINCIPAIS TÉCNICAS PARA A EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS DO ALECRIM



FONTE: A autora (2026).

Entre as técnicas de extração de óleos essenciais, a hidrodestilação e a destilação por arraste de vapor são amplamente utilizadas. Além disso, técnicas inovadoras como a hidrodestilação assistida por micro-ondas, que diminui o tempo de extração, e a hidrodifusão por micro-ondas, uma extração combinada de compostos voláteis e não voláteis que não usa solvente, têm mostrado resultados promissores (Seidi et al., 2016; Navarrete et al., 2011).

A maceração é o método mais simples e clássico de extração de ervas, entretanto, processos mais avançados, como a extração acelerada por solvente, a extração assistida por ultrassom e a extração com fluido supercrítico usando dióxido de carbono (CO₂), são reconhecidos como métodos de extração verde, sendo ambientalmente preferíveis e sustentáveis. Esses métodos oferecem grandes vantagens, como a significativa redução no tempo de extração, maiores rendimentos e a obtenção de extratos de alta qualidade. A extração assistida por micro-ondas, que utiliza o fenômeno de cavitação, também se destaca e pode ser empregada como um método de pré-tratamento para melhorar ainda mais a eficiência dos processos de extração (Ayyildiz, Pelvan e Karadeniz, 2024; Selvamuthukumaran e Shi, 2017; Rodríguez-Rojo et al. 2012).

3.3.1 Extração de compostos voláteis

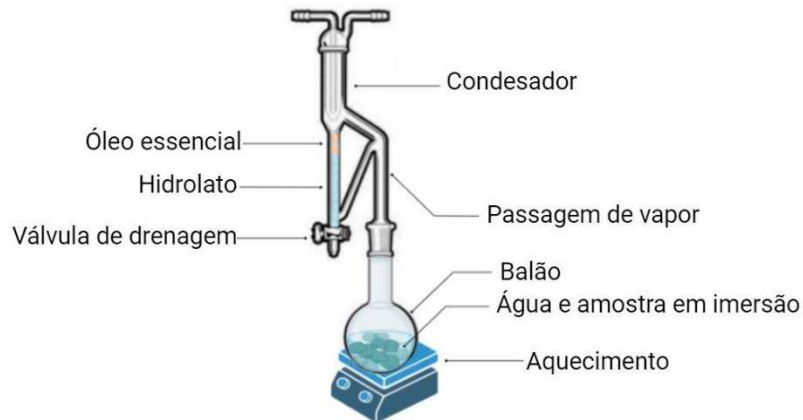
3.3.1.1 Hidrodestilação

No processo de extração por hidrodestilação, o material vegetal é diretamente imerso e fervido em água destilada. O vapor gerado passa pela matéria vegetal, transferindo os compostos voláteis para a superfície da matriz vegetal para subsequente separação. Esse vapor é então condensado, resultando em uma mistura de água e compostos voláteis provenientes da matéria vegetal (Boufetacha et al., 2024). Quando a hidrodestilação é realizada com um aparelho de Clevenger, a separação da água e do óleo essencial é facilitada pelo design específico do coletor, que possui uma válvula ou saída destinada ao escoamento do óleo (Figura 5).

Os compostos aromáticos voláteis e a água formam uma mistura azeotrópica, que pode ser evaporada conjuntamente sob pressão similar, sendo posteriormente condensada e separada devido à imiscibilidade e à diferença de densidade entre a água e os óleos essenciais insolúveis em água. Embora seja um processo relativamente lento, esta técnica é simples de utilizar, segura por não empregar solventes tóxicos e produz óleos essenciais de alta qualidade. No entanto, devido à exposição prolongada a altas temperaturas, alguns compostos voláteis e outros

constituintes, como ésteres, podem sofrer degradação, hidrólise parcial e reações de rearranjo (Boufetacha et al., 2024).

FIGURA 5 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA OBTENÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL POR MEIO DE HIDRODESTILAÇÃO EM APARELHO CLEVINGER



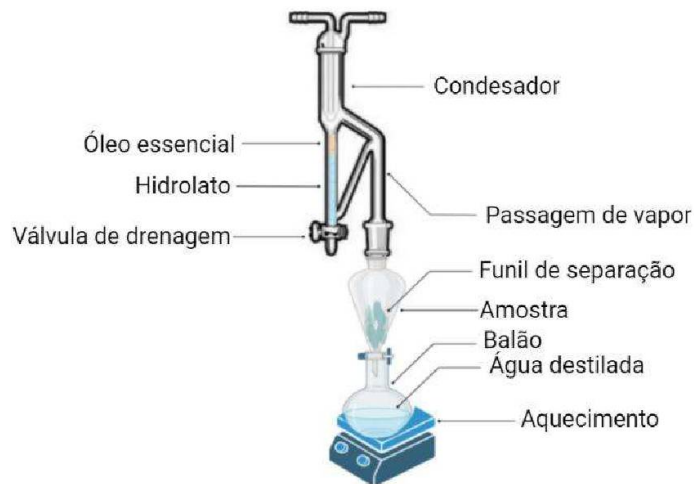
FONTE: A autora (2026).

3.3.1.2 Destilação por arraste de vapor

A destilação por arraste de vapor é realizada em condições semelhantes à hidroddestilação. Neste processo, o material vegetal é separado da água e colocado em um funil de separação. A parte inferior do funil é conectada diretamente a um balão contendo água em aquecimento, enquanto a parte superior é conectada ao aparelho de Cleveenger e a um condensador. O vapor de água sobe através do material vegetal, transportando os compostos voláteis para o condensador, onde o vapor é liquefeito, e a mistura de água e óleo é separada por drenagem (Figura 6) (Boufetacha et al., 2024).

A vantagem deste método reside na sua capacidade de extrair óleos essenciais preservando sua qualidade, utilizando temperaturas moderadas, abaixo de 100°C (Boufetacha et al., 2024). No entanto, assim como na hidroddestilação, os óleos essenciais insolúveis em água podem ser coletados, mas os componentes da fase aquosa são frequentemente perdidos, uma vez que são pobres em compostos fenólicos (Zhang et al., 2022).

FIGURA 6 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA OBTENÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL POR MEIO DE ARRASTE DE VAPOR EM APARELHO CLEVANGER

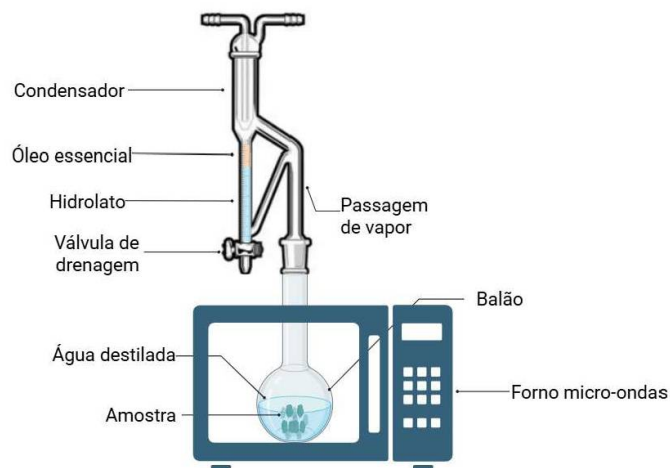


FONTE: A autora (2026).

3.3.1.3 Hidrodestilação assistida por micro-ondas

A hidrodestilação assistida por micro-ondas é uma variação da hidrodestilação que utiliza um forno de micro-ondas no processo de extração de óleos essenciais (Figura 7) (Golmakani e Rezaei, 2008). O aquecimento por micro-ondas fragiliza ou rompe as paredes celulares, resultando em uma aceleração da cinética do processo de extração de óleos essenciais (Elyemni et al., 2019). A combinação destes dois métodos também resulta em economia de tempo e redução de custos operacionais (Seidi et al., 2016).

FIGURA 7 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA OBTENÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL POR MEIO DE HIDRODESTILAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS EM APARELHO CLEVANGER



FONTE: A autora (2026).

Por não necessitar de várias horas de aquecimento para atingir a extração completa, como ocorre no método tradicional de hidrodestilação, não são observadas alterações adversas nas composições químicas dos óleos essenciais. O método combinado evita a degradação de compostos por meio de efeitos térmicos ou hidrolíticos e a perda de componentes voláteis (Seidi et al., 2016). Todavia, as diferenças nas composições químicas dos óleos essenciais obtidos pelo método tradicional de hidrodestilação e pela hidrodestilação assistida por micro-ondas muitas vezes são insignificantes (Golmakani e Rezaei, 2008; Seidi et al., 2016; Elyemni et al., 2019).

3.3.1.4 Hidrodifusão por micro-ondas a gravidade

A hidrodifusão por micro-ondas e a gravidade é um método de extração sem solvente que combina aquecimento por micro-ondas com gravidade à pressão atmosférica. Esse método permite a extração simultânea de frações voláteis (óleo essencial) e não voláteis (extrato aquoso rico em compostos fenólicos). Inicialmente, a extração é realizada por micro-ondas sem o uso de solventes, apenas com a amostra umidificada. A irradiação por micro-ondas aquece o material vegetal imediatamente, e o aumento da temperatura e da pressão dentro das células vegetais causa ruptura física, liberando os compostos para o meio (Navarrete et al., 2011; Ferreira et al., 2020).

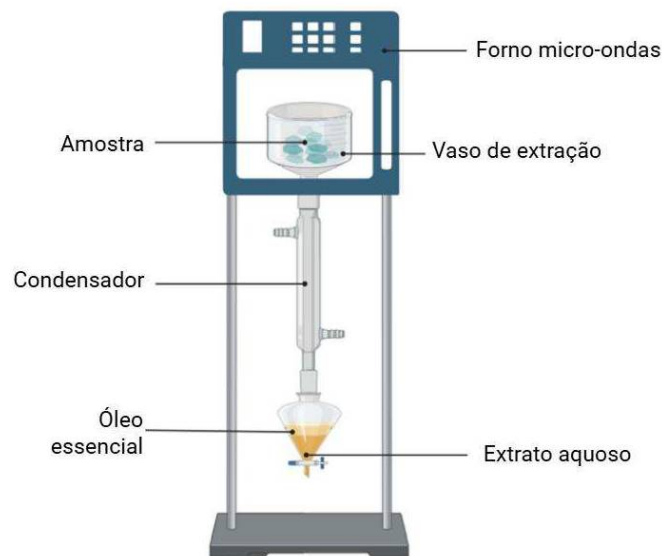
Os compostos liberados do material vegetal são drenados por gravidade através de um condensador externo à cavidade do micro-ondas e coletados em um funil de separação. Este método não exige a evaporação do óleo para sua recuperação, uma vez que o óleo essencial é separado do extrato aquoso por densidade (Figura 8) (Navarrete et al., 2011; Ferreira et al., 2020).

As técnicas utilizadas para a destilação de óleos essenciais e o subsequente processamento do resíduo normalmente afetam a composição dos compostos fenólicos do extrato devido à degradação térmica. No entanto, a hidrodifusão por micro-ondas e gravidade, ao evitar a fervura contínua da biomassa em água por horas, preserva muitos componentes polares. Dessa forma, os compostos fenólicos do material vegetal são mantidos no extrato aquoso, que, se necessário, pode passar por uma nova extração (De Elguea-Culebras, Bravo e Sánchez-Vioque, 2022; Chouhan et al., 2019).

A hidrodifusão por micro-ondas e gravidade permite a extração simultânea das frações de óleo essencial e dos compostos fenólicos de maneira rápida e sem solventes, proporcionando aumento de produtividade, bem como economia significativa de energia e custos. Essas

características são importantes para aplicações industriais. Contudo, as limitações deste método incluem a capacidade limitada do micro-ondas, projetado para pequenas quantidades de amostras, e a acessibilidade a esse aparato (De Elguea-Culebras, Bravo e Sánchez-Vioque, 2022; Chouhan et al., 2019).

FIGURA 8 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS POR MEIO DE HIDRODIFUSÃO POR MICRO-ONDAS A GRAVIDADE



FONTE: A autora (2026).

As técnicas de extração de óleos essenciais (compostos voláteis) do alecrim apresentadas no texto variam em seus princípios, eficiência, tempo de extração e impactos na qualidade do produto. O Quadro 1 compila as principais características, vantagens e desvantagens dos métodos de extração de compostos voláteis citados.

QUADRO 1 - COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

Técnica	Característica Principal	Vantagens	Desvantagens
Hidrodestilação	Material vegetal imerso e fervido em água. O vapor é condensado e o óleo essencial é separado.	Simple de usar, seguro (não usa solventes tóxicos), produz óleos essenciais de alta qualidade.	Processo relativamente lento. Degradação/hidrólise parcial de ésteres e outros constituintes devido à exposição prolongada a altas temperaturas.
Destilação por Arraste de Vapor	Vapor de água gerado separadamente passa através do material vegetal, transportando os voláteis.	Preserva a qualidade dos óleos essenciais. Utiliza temperaturas moderadas (abaixo de 100°C)	Componentes da fase aquosa (pobres em fenólicos) são frequentemente perdidos.

Quadro 1. (Conclusão)			
Hidrodestilação Assistida por Micro-ondas	Combina hidrodestilação com aquecimento por micro-ondas.	Significativa redução no tempo de extração. Economia de custos operacionais. Evita a degradação e a perda de componentes voláteis observadas na hidrodestilação tradicional.	As diferenças nas composições químicas dos óleos essenciais em relação à hidrodestilação tradicional podem ser insignificantes.
Hidrodifusão por Micro-ondas a Gravidade	Aquecimento por micro-ondas sem solventes, seguido de drenagem por gravidade. Permite a extração simultânea de frações voláteis e não voláteis.	Extração rápida e sem solventes. Extração simultânea de óleo essencial e compostos fenólicos. Aumenta a produtividade e economiza energia/custos. Preserva muitos componentes polares (compostos fenólicos).	Capacidade limitada do micro-ondas (projetado para pequenas quantidades de amostras). Acessibilidade ao aparato pode ser uma limitação.

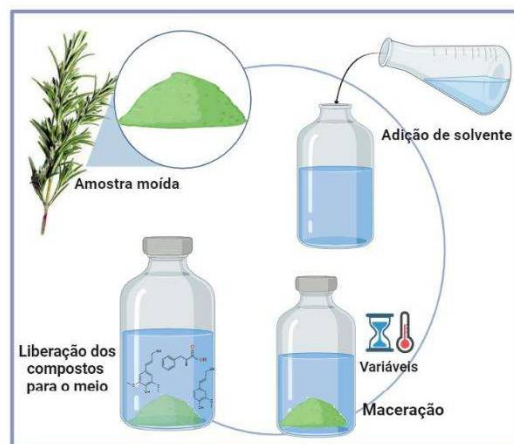
FONTE: A autora (2026).

3.3.2 Extração de compostos não voláteis

3.3.2.1 Maceração

A maceração é o método mais simples e clássico de extração sólido-líquido de ervas utilizando solventes para obter extratos naturais (Vieitez et al., 2018). Neste procedimento, o solvente é adicionado a um recipiente tampado contendo a amostra inteira ou grosseiramente moída. O recipiente é então deixado em repouso à temperatura ambiente até que os compostos solúveis se dissolvam. O tempo de maceração e a agitação do sistema podem variar conforme a natureza da amostra e o objetivo da extração (Malini, Saranya e Pameswari, 2023).

FIGURA 9 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR MEIO DA MACERAÇÃO



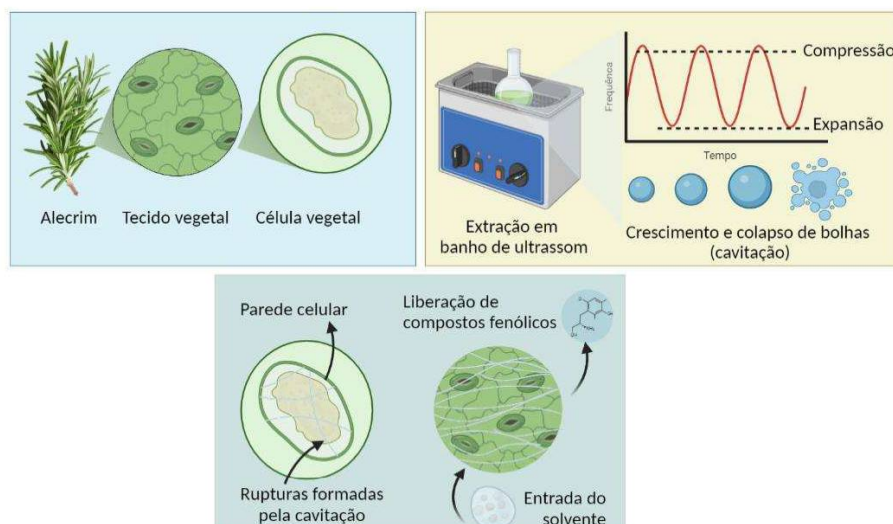
FONTE: A autora (2026).

O objetivo da maceração é isolar os componentes desejados do material inerte usando um solvente seletivo. Para obter resultados ideais, é fundamental utilizar material fresco. A escolha do solvente é determinada pela solubilidade dos componentes desejados. A técnica de maceração é adequada quando a amostra ou a parcela de interesse requer um solvente diferente de um azeótropo ou de um solvente puro em ebulição. Apesar de sua menor eficiência em comparação com métodos mais modernos, a maceração é valorizada por seu baixo custo e simplicidade (Malini, Saranya e Parameswari, 2023).

3.3.2.2 Extração assistida por ultrassom

O método de extração assistida por ultrassom utiliza ondas ultrassônicas com frequência entre 20 kHz e 100 MHz. Essas ondas se propagam através do solvente e da amostra, gerando bolhas de cavitação devido às regiões alternadas de compressão e expansão. Esse processo resulta no fenômeno de cavitação, que promove a formação, crescimento e colapso das bolhas. O colapso dessas bolhas próximo à superfície do material vegetal causa a ruptura das paredes celulares e a liberação dos compostos fenólicos no solvente (Ali, Chua e Chow, 2019; Selvamuthukumar e Shi, 2017). A Figura 10 ilustra o processo de obtenção de compostos fenólicos por meio da extração assistida por ultrassom e o fenômeno de cavitação.

FIGURA 10 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR MEIO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM



FONTE: A autora (2026).

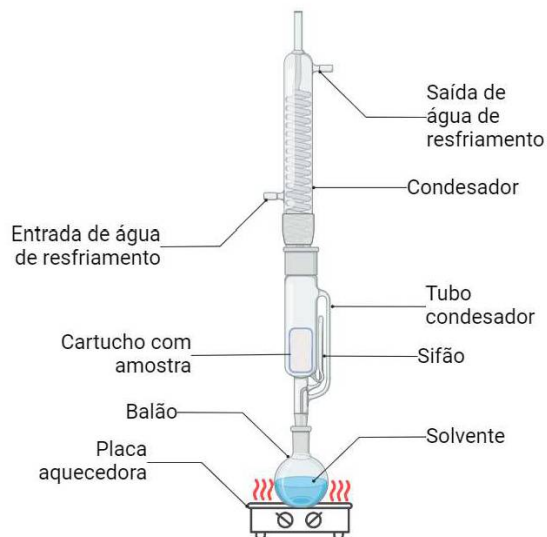
Como diferentes compostos são extraídos com diferentes solventes, a seleção do solvente é determinada pelos compostos fenólicos alvo. Os solventes tradicionais mais utilizados para essa técnica incluem água, etanol, metanol e suas misturas. Por exemplo, o ácido rosmarínico é mais solúvel em soluções aquosas, enquanto os ácidos ursólico e oleanólico têm maior solubilidade em solventes orgânicos. Concentrações de 70% de etanol são eficazes para a extração do ácido rosmarínico, enquanto concentrações de 90% de etanol favorecem a extração dos ácidos ursólico e oleanólico (Ali, Chua e Chow, 2019; Bernatoniene et al., 2016).

Além da escolha do solvente, a eficiência da extração é influenciada por várias variáveis, incluindo as propriedades do soluto, do solvente e as condições da extração assistida por ultrassom, como tempo, temperatura, tamanho das partículas e a relação soluto/solvente. Essas variáveis devem ser cuidadosamente controladas para otimizar o rendimento e a qualidade dos compostos fenólicos (Ali, Chua e Chow, 2019; Bernatoniene et al., 2016).

3.3.2.3 Extração por Soxhlet

A extração por Soxhlet (Figura 11) é um método simples e versátil que não exige instrumentos caros. O sistema de extração Soxhlet consiste em um balão de fundo redondo colocado em uma manta aquecedora, acoplado a uma câmara de extração horizontal e a um condensador principal. O condensador é conectado a um abastecimento de água que atua como refrigerante (Laina et al., 2021).

FIGURA 11 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR MEIO DA EXTRAÇÃO POR SOXHLET



FONTE: A autora (2026).

A amostra é colocada em um recipiente de papel prensado e inserida na câmara de extração do dispositivo. O solvente é aquecido e vaporizado, o vapor de solvente sobe pelo braço lateral e condensa no condensador. O solvente líquido então goteja sobre a amostra contida no dedal de extração. Quando o solvente atinge um determinado nível no dedal, ele é sifonado de volta para o balão de fundo redondo, carregando consigo os compostos extraídos. Esse ciclo se repete várias vezes, permitindo uma extração eficiente dos compostos desejados (Laina et al., 2021).

A extração Soxhlet é amplamente utilizada em escala laboratorial para recuperar extratos ricos em fenólicos. Este método emprega solventes com alta capacidade de formação de ligações de hidrogênio, como metanol e acetona, resultando em altos rendimentos de compostos antioxidantes, especialmente diterpenos fenólicos (Irakli et al., 2023). A eficiência da técnica pode ser otimizada ajustando o tamanho das partículas dos sólidos, a composição do solvente, a relação sólido-solvente e o tempo de extração, com o objetivo principal de maximizar o rendimento (Laina et al., 2021).

No entanto, o método apresenta desvantagens significativas devido às altas temperaturas e ao tempo prolongado de processamento (Irakli et al., 2023). Muitos compostos funcionais presentes no alecrim são termolábeis, portanto, as altas temperaturas durante a extração podem levar à sua degradação e à redução da bioatividade dos extratos obtidos (Lešnik, Furlan e Bren, 2021).

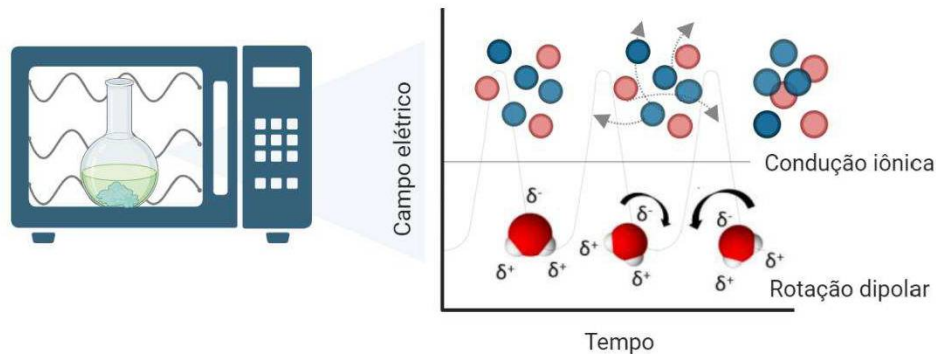
3.3.2.4 Extração assistida por micro-ondas

O sistema de extração por micro-ondas permite a dispersão uniforme da radiação de micro-ondas na cavidade de extração. As micro-ondas são ondas eletromagnéticas não ionizantes com frequências que variam entre 300 MHz e 300 GHz. A extração pode ser realizada sob pressão atmosférica (sistema aberto) ou alta pressão (sistema fechado) (Kumar, Umama e Khan, 2019).

Como forma de energia eletromagnética, as micro-ondas possuem campos elétricos e magnéticos que são perpendiculares entre si. Esses campos elétricos aquecem as amostras através de dois mecanismos simultâneos: a rotação dipolar e a condução iônica. Na rotação dipolar, moléculas com dipolo (permanente ou induzido) tentam alinhar-se com o campo elétrico das micro-ondas, provocando oscilações e colisões entre as moléculas. Na condução iônica, os íons presentes na amostra movimentam-se sob a influência do campo elétrico, causando colisões com outras moléculas. Esses dois mecanismos, ilustrados na Figura 12,

geram calor rapidamente e de forma homogênea em toda a amostra (Rodríguez-Rojo et al., 2012).

FIGURA 12 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS MECANISMOS ATUANTES NA EXTRAÇÃO POR MICRO-ONDAS



FONTE: A autora (2026).

Ao contrário dos métodos tradicionais de aquecimento, que transferem calor de fora para dentro, a extração por micro-ondas aquece a amostra internamente. A água presente nas células vegetais absorve a energia das micro-ondas, causando um superaquecimento interno. Esse aumento de temperatura e pressão dentro das células resulta na ruptura física das células e na lixiviação dos constituintes ativos para o meio circundante. Esse fenômeno pode ser intensificado se a matriz vegetal for submersa em um solvente que tenha maior eficiência de aquecimento sob micro-ondas (Rodríguez-Rojo et al., 2012; Ferreira et al., 2020; Kumar, Umama e Khan, 2019).

A eficiência da extração por micro-ondas é influenciada por várias condições operacionais, como a natureza do solvente, o tempo de extração, a potência das micro-ondas e a temperatura. A escolha do solvente adequado é crucial e deve considerar a solubilidade do composto alvo, a penetração do solvente e a interação com a matriz da amostra. Embora soluções aquosas sejam frequentemente desejadas, solventes como etanol, metanol e acetona também são eficazes. A potência, a temperatura e o tempo de extração devem ser otimizados para maximizar o rendimento e minimizar a degradação térmica e a oxidação de compostos sensíveis ao calor (Kumar, Umama e Khan, 2019).

Além disso, as micro-ondas podem ser utilizadas como método de pré-tratamento. A extração por micro-ondas sem solvente, utilizando apenas água para umedecer a amostra, pode

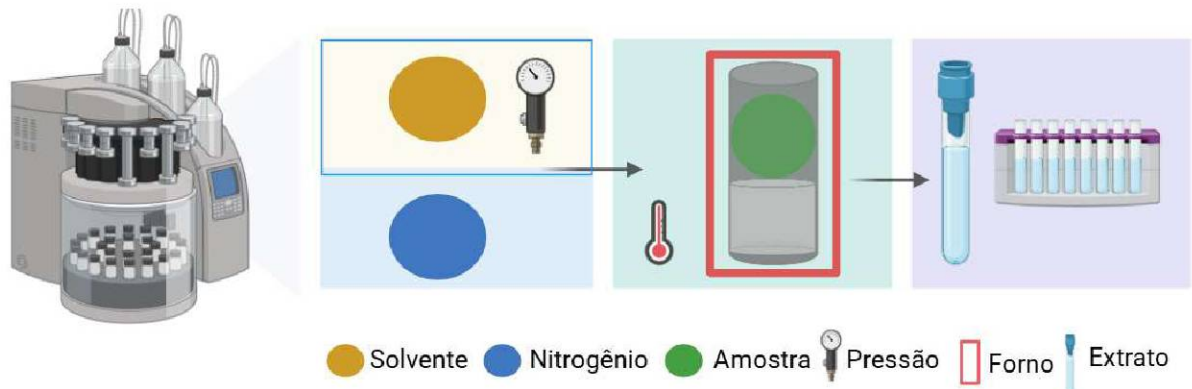
melhorar o rendimento da extração tanto dos compostos do extrato quanto do óleo essencial. Esse pré-tratamento é essencial para superar limitações na transferência de massa interna e para aumentar a eficiência da extração subsequente (Rodríguez-Rojo et al., 2012). No entanto, a aplicação industrial da tecnologia de micro-ondas ainda é limitada devido à dificuldade de expandir os fornos de micro-ondas para escala industrial (González-Rivera et al., 2016).

3.3.2.5 Extração por líquido pressurizado

A extração por líquido pressurizado, também conhecida como extração acelerada por solvente, é uma técnica sólido-líquido que utiliza alta pressão e temperatura para extrair compostos bioativos de matrizes vegetais. Este método é eficiente para aumentar a solubilidade do solvente, bem como para melhorar a difusão e penetração nas células vegetais (Lefebvre, Destandau e Lesellier, 2021).

No processo, a amostra (0,5 - 10 g) é colocada na parte superior da célula de extração, e um suporte sólido é adicionado até preencher completamente o espaço disponível. Um filtro de membrana de náilon ou celulose é colocado na tampa da extremidade inferior da célula. A célula é então posicionada no forno para aquecimento, enquanto uma bomba de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) fornece o solvente para a célula. O solvente é aquecido e circulado através da célula até que a pressão definida seja alcançada. Este procedimento é conhecido como extração dinâmica. Uma vez atingida a temperatura e pressão desejadas, a célula é mantida em extração estática por um intervalo de tempo específico. Após o período de extração estática, o solvente fresco é bombeado através da célula para promover a extração efetiva dos compostos. Um circuito de gás inerte, geralmente nitrogênio, é utilizado para assegurar um fluxo contínuo de solvente através da célula e garantir que todo o material seja lixiviado das linhas após a extração estática. O solvente é então liberado, e o extrato resultante é coletado em tubos ou vasos, concluindo um ciclo de extração (Figura 13). Este processo pode ser repetido em múltiplos ciclos para maximizar a extração dos compostos desejados (Lefebvre, Destandau e Lesellier, 2021; Fraguera-Meissimilly et al., 2023; Barp, Višnjevec e Moret, 2023).

FIGURA 13 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO DE LÍQUIDO PRESSURIZADO E SEU FUNCIONAMENTO



FONTE: A autora (2026).

O calor na extração por líquido pressurizado (PLE) aumenta a taxa de difusão e facilita a quebra das interações entre a matriz e o analito, enquanto a alta pressão mantém o solvente abaixo do seu ponto de ebulição. Esses efeitos combinados resultam em uma melhoria no rendimento da extração, mas podem reduzir a seletividade do processo. O tempo também desempenha um papel crucial, especialmente em altas temperaturas, pois pode intensificar as reações de degradação que ocorrem diretamente na célula de extração. A temperatura pode impactar a extração seletiva dos compostos de forma positiva ou negativa, dependendo de sua estrutura química. Apesar de a pressão permitir o uso de temperaturas superiores ao ponto de ebulição do solvente, não é sempre necessário aplicar calor excessivo. Adicionalmente, o número de ciclos de extração influencia a eficiência do processo (Lefebvre, Destandau e Lesellier, 2021; Fraguera-Meissimilly et al., 2023).

Dado que a eficiência da PLE depende de parâmetros críticos como o solvente, a pressão, a temperatura, o volume de descarga e o número de ciclos de extração, o planejamento experimental é essencial para otimizar esses fatores. Esse planejamento permite avaliar não apenas os efeitos individuais de cada parâmetro, mas também suas interações. Em particular, ao extrair analitos termolábeis, deve-se prestar especial atenção à temperatura para evitar a degradação dos compostos sensíveis (Hoff e Pizalato, 2018).

As técnicas de extração sólido-líquido apresentadas para a recuperação de compostos não voláteis variam amplamente em termos de simplicidade, custo, eficiência e o uso de métodos verde. O Quadro 2 compila as principais características, vantagens e desvantagens dos métodos de extração de compostos não voláteis citados.

QUADRO 2 - COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS

Técnica	Característica Principal	Vantagens	Desvantagens
Maceração	Método clássico e simples. Solvente e amostra em repouso à temperatura ambiente.	Baixo custo e simplicidade de uso. Adequado para amostras sensíveis ao calor.	Menor eficiência em comparação com métodos modernos. Lento (longo tempo de extração).
Extração Assistida por Ultrassom	Utiliza ondas ultrassônicas (cavitação) para romper as paredes celulares e liberar os compostos.	Rápida e eficiente na ruptura celular. Redução no tempo de extração. Considerado um método verde.	A eficiência depende do controle rigoroso de variáveis como tempo, temperatura, solvente, e relação soluto/solvente.
Extração por Soxhlet	Extração cíclica contínua. Solvente vaporiza, condensa sobre a amostra e sifona o extrato de volta ao balão.	Método simples e versátil, não exige instrumentos caros. Resultados em altos rendimentos de diterpenos fenólicos.	Altas temperaturas e tempo prolongado de processamento. Risco de degradação de compostos termolábeis e redução da bioatividade.
Extração Assistida por Micro-ondas (EAM)	Aquecimento interno da amostra por rotação dipolar e condução iônica, causando a ruptura celular.	Aquecimento rápido e homogêneo (de dentro para fora). Redução no tempo de extração. Pode ser usado como pré-tratamento sem solvente para maior eficiência.	A aplicação industrial é limitada (dificuldade de expandir o forno para escala industrial). Necessidade de otimizar potência, temperatura e tempo para evitar degradação.
Extração por Líquido Pressurizado (PLE)	Utiliza alta pressão e temperatura para aumentar a solubilidade, difusão e penetração do solvente.	Melhora o rendimento da extração. Rápida (redução no tempo). A alta pressão mantém o solvente abaixo do seu ponto de ebulição (apesar de usar altas temperaturas). Considerado um método verde.	O aumento da temperatura pode intensificar as reações de degradação (necessidade de planejamento experimental). Pode reduzir a seletividade do processo.

FONTE: A autora (2026).

3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ALECRIM

O alecrim (*R. officinalis*) contém pelo menos 140 compostos identificáveis tanto na fração volátil (óleo essencial) quanto na fração não volátil (extrato). Os constituintes predominantes da fração volátil são monoterpenos como 1,8-cineol, α -pineno, cânfora, canfeno, β -pineno, mirceno, borneol e linalol, além de flavonoides como apigenina e a luteolina (Aziz et al., 2022; Ali, Chua e Chow, 2019). Por outro lado, a fração não volátil é composta principalmente por ácidos fenólicos, diterpenos, triterpenos e flavonoides. Entre os principais ácidos fenólicos presentes no extrato de alecrim estão os ácidos rosmarínico e cafeico. A classe dos diterpenos inclui compostos como ácido carnósico, carnosol e rosmanol, enquanto os triterpenos são representados pelo ácido oleanólico e ácido ursólico. Na classe dos flavonoides,

destaca-se a galocatequina (Bouammali et al., 2023; Ali, Chua e Chow, 2019; Christopoulou et al., 2021).

3.4.1 Compostos voláteis

A Tabela 1 apresenta os principais compostos voláteis presentes no óleo essencial de alecrim obtidos por diferentes métodos de extração. Esta caracterização oferece uma visão do perfil fitoquímico do alecrim e possibilita a comparação entre as técnicas de extração. Além disso, a tabela ilustra as variações na composição química do óleo essencial resultantes dos diferentes métodos de extração, bem como as flutuações na composição dentro de cada método.

TABELA 1 – CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE ALECRIM POR MEIO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE HIDRODESTILAÇÃO (HD), DESTILAÇÃO POR ARRASTE DE VAPOR (SD) E HIDRODIFUSÃO POR MICRO-ONDAS E GRAVIDADE (MHG)

Composto	Técnica de extração	Volume de água (mL) por 100 g de alecrim	Tempo (min)	Origem da amostra	Teor (%)	Referências
Cânfora		1000	180	Alecrim selvagem, Taourirt, Maroccos	8,44	Boufetacha et al., 2024
	HD	1000	240	Abu Dhabi, Emirados Árabes Unidos	12,20	Hudaib et al., 2022
		800	180	Fez, Maroccos	16,54	Elyemmi et al., 2019
		500	180	Santa Maria, Brasil	17,33	Ferreira et al., 2020
	SD	1000	180	Alecrim selvagem, Taourirt, Maroccos	6,90	Boufetacha et al., 2024
1,8-cineol	MHG	250	20	Rio Grande do Sul, Brasil	17,51	Ferreira et al., 2020
		1000	240	Abu Dhabi, Emirados Árabes Unidos	25,50	Hudaib et al., 2022
	HD	500	180	Santa Maria, Brasil	47,59	Ferreira et al., 2020
		1000	180	Alecrim selvagem, Taourirt, Maroccos	50,30	Boufetacha et al., 2024
	SD	1000	180	Alecrim selvagem, Taourirt, Maroccos	43,00	Boufetacha et al., 2024
α-pineno	MHG	250	20	Rio Grande do Sul, Brasil	47,75	Ferreira et al., 2020
		1000	180	Alecrim selvagem, Taourirt, Maroccos	10,70	Boufetacha et al., 2024
	HD	1000	240	Abu Dhabi, Emirados Árabes Unidos	11,70	Hudaib et al., 2022
		500	180	Santa Maria, Brasil	12,86	Ferreira et al., 2020
		800	180	Fez, Maroccos	15,82	Elyemmi et al., 2019
Borneol	SD	1000	180	Alecrim selvagem, Taourirt, Maroccos	10,70	Boufetacha et al., 2024
	MHG	250	20	Rio Grande do Sul, Brasil	12,51	Ferreira et al., 2020
		1000	240	Abu Dhabi, Emirados Árabes Unidos	0,30	Hudaib et al., 2022
	HD	800	180	Fez, Maroccos	1,47	Elyemmi et al., 2019
		500	180	Rio Grande do Sul, Brasil	4,14	Ferreira et al., 2020
Canfeno		1000	180	Alecrim selvagem, Taourirt, Maroccos	5,33	Boufetacha et al., 2024
	SD	1000	180	Alecrim selvagem, Taourirt, Maroccos	5,12	Boufetacha et al., 2024
	MHG	250	20	Rio Grande do Sul, Brasil	5,01	Ferreira et al., 2020
		500	180	Rio Grande do Sul, Brasil	3,80	Ferreira et al., 2020
	HD	1000	180	Alecrim selvagem, Taourirt, Maroccos	6,11	Boufetacha et al., 2024
	1000	240	Abu Dhabi, Emirados Árabes Unidos	9,00	Hudaib et al., 2022	
	800	180	Fez, Maroccos	9,77	Elyemmi et al., 2019	
	SD	1000	180	Rio Grande do Sul, Brasil	4,86	Ferreira et al., 2020
	MHG	250	20	Alecrim selvagem, Taourirt, Maroccos	2,48	Boufetacha et al., 2024

Tabela 1. (Conclusão)

Composto	Técnica de extração	Volume de água (mL) por 100 g de alecrim	Tempo (min)	Origem da amostra	Teor (%)	Referências
β-pineno	HD	1000	240	Abu Dhabi, Emirados Árabes Unidos	2,40	Hudaib et al., 2022
		800	180	Fez, Marocco	3,56	Elyemmi et al., 2019
		500	180	Rio Grande do Sul, Brasil	4,16	Ferreira et al., 2020
Mirceno	SD	1000	180	Alecrim selvagem, Taourirt, Morocos	7,73	Boufetacha et al., 2024
		1000	180	Alecrim selvagem, Taourirt, Morocos	6,99	Boufetacha et al., 2024
		250	20	Rio Grande do Sul, Brazil	3,25	Ferreira et al., 2020
Mirceno	HD	1000	240	Abu Dhabi, Emirados Árabes Unidos	0,40	Hudaib et al., 2022
		1000	180	Alecrim selvagem, Taourirt, Morocos	1,11	Boufetacha et al., 2024
		500	180	Rio Grande do Sul, Brasil	1,46	Ferreira et al., 2020
Mirceno	SD	1000	180	Alecrim selvagem, Taourirt, Morocos	1,46	Boufetacha et al., 2024
		250	20	Rio Grande do Sul, Brasil	1,14	Ferreira et al., 2020

HD: Extração de hidrodestilação. SD: Destilação por arraste de vapor. MGH: Hidrodistilação por micro-ondas e gravidade.

FONTE: A autora (2026).

Os dados apresentados na literatura demonstram que o 1,8-cineol, a cânfora e o α -pineno são os principais monoterpênicos presentes no óleo essencial de alecrim, independentemente do método de extração empregado. Os monoterpênicos β -pineno e mirceno exibem uma faixa de variação mais estável, independentemente do método de extração, das condições operacionais ou da origem da amostra. No entanto, a ampla variação observada para os demais compostos sugere que, além da escolha do método de extração, outros fatores influenciam significativamente o perfil fitoquímico do óleo essencial. Variações dentro do mesmo método de extração, como o teor de 1,8-cineol, que varia de 50,30% a 25,50% sob hidrodestilação, provavelmente estão associadas a diferenças nas condições operacionais, incluindo o tempo de extração, interações solvente-matriz e a origem da amostra.

3.4.2 Compostos não voláteis

A Tabela 2 oferece um panorama dos compostos não voláteis identificados no extrato de alecrim, caracterizados por diferentes métodos de extração. A tabela inclui a análise dos principais ácidos fenólicos, diterpenos, triterpenos e flavonoides presentes, bem como algumas das técnicas de extração empregadas. A apresentação desses dados possibilita uma avaliação comparativa das metodologias utilizadas e destaca a composição química do extrato de alecrim em relação aos métodos de extração empregados, além das variações observadas dentro de cada técnica.

TABELA 2 – CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE ALECRIM POR MEIO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SFE), EXTRAÇÃO POR LÍQUIDO PRESSURIZADO (PLE), EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (UAE), EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS (MAE) E EXTRAÇÃO SOXHLET (SE).

Composto	Técnica de extração	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressão (bar)	mg composto /g extrato	Referências	Condições extração					
SFE	CO ₂ + 7% Etanol	40	300	150	151,33	Herrero et al., 2010	Origem da amostra: Múrcia, Espanha. Equipamento de extração: Extrator de fluidos supercríticos em escala piloto. Quantidade de alecrim por experimento: 0,5 kg. Taxa de fluxo de CO ₂ : 60 g/min.						
								Passo 1: 40	Passo 1: 60	Passo 1: 300			
	7% Etanol	Passo 2: 40	Passo 2: 120	Passo 2: 150	403,04	Sánchez-Camargo et al., 2014.	Origem da amostra: Múrcia, Espanha. Duas etapas: Etapa 1 – Remoção das frações interferentes menos ativas. Etapa 2 – Enriquecimento dos fenólicos mais polares. Equipamento de extração: Extrator de fluidos supercríticos em escala piloto. Quantidade de alecrim por experimento: 0,5 kg. Taxa de fluxo de CO ₂ : 60 g/min						
								Passo 1: 40	Passo 1: 60	Passo 1: 300			
Ácido Carnósico	Etanol	50	20	100	76,28	Herrero et al., 2010	Origem da amostra: Múrcia, Espanha. Equipamento de extração: Extrator de solvente acelerado equipado com controlador de solvente. Volume da célula de extração: 11 mL. Quantidade de amostra: 1 g de amostra por célula.						
								Hexano	100	10	161,49	Vázquez et al., 2013	Origem da amostra: Múrcia, Espanha. Equipamento de extração: Sistema ASE 350 da Dionex Corporation equipado com controlador de solvente. Volume da célula de extração: 10 mL. Quantidade de amostra: 1 g de amostra por célula.
UAE	71.3% Etanol	35,3	20,3	atm	23,00	Xie et al., 2023	Origem da amostra: Hunan, China. Equipamento de extração: Extrator ultrassônico com potência de 22,5,4 W. Quantidade de alecrim por experimento: 10 g. Volume de etanol-água: 130 mL.						

Tabela 2. (Continua)

Composto	Técnica de extração	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressão (bar)	mg composto /g extrato	Referências	Condições extração
	UAE	80% Etanol	51	10	atm	298,59	Irakli et al., 2023	Origem da amostra: Atenas, Grécia. Equipamento de extração: Extrator ultrassônico com gerador GM 4200. Condições: Frequência de 20 kHz. Quantidade de alecrim por experimento: 25 g. Volume da mistura etanol-água: 20 mL.
	MAE	67,4% Etanol	70	15	atm	307,08	Irakli et al., 2023	Origem da amostra: Atenas, Grécia. Equipamento de extração: Extrator ultrassônico com gerador GM 4200. Condições: Frequência de 20 kHz. Quantidade de alecrim por experimento: 25 g. Volume da mistura etanol-água: 20 mL.
Ácido Carnósico		Metanol	70	360	atm	2,91	Sharma et al., 2020	Origem da amostra: Iowa, EUA. Quantidade de alecrim por experimento: 10 g. Razão sólido-solvente: 1:25.
	SE	Hexano e acetato de etila	-	720	atm	177,30	Kontogianni et al., 2013	Origem da amostra: Amostra comercial de <i>R. officinalis</i> . Solventes: Dois solventes com polaridade crescente. Extração: 6 horas para cada solvente.
		70% Etanol	-	240	atm	306,17	Irakli et al., 2023	Origem da amostra: Atenas, Grécia. Quantidade de alecrim por experimento: 5 g. Razão sólido-solvente: 1:25.
Carnosol		CO ₂ + 7% Etanol	40	300	150	45,61	Del Pilar Sanchez-Camargo et al., 2014.	Origem da amostra: Múrcia, Espanha. Equipamento de extração: Extrator de fluidos supercríticos em escala piloto. Quantidade de alecrim por experimento: 0,5 kg. Taxa de fluxo de CO ₂ : 60 g/min.
	SFE	CO ₂ + 7% Etanol	40	300	150	226,39	Herrero et al., 2010	Origem da amostra: Múrcia, Espanha. Equipamento de extração: Extrator de fluidos supercríticos em escala piloto. Quantidade de alecrim por experimento: 0,5 kg. Taxa de fluxo de CO ₂ : 60 g/min.

Tabela 2. (Continuação)

Composto	Técnica de extração	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressão (bar)	mg composto /g extrato	Referências	Condições extração
		Hexano	100	10	100	13,64	Vázquez et al., 2013	Origem da amostra: Múrcia, Espanha. Equipamento de extração: Sistema ASE 350 da Dionex Corporation equipado com controlador de solvente. Volume da célula de extração: 10 mL. Quantidade de amostra: 1 g de amostra por célula.
	PLE	59% Etanol	125	7	103.4	100,16	Irakli et al., 2023	Origem da amostra: Atenas, Grécia. Equipamento de extração: Extrator de solvente acelerado Thermo Fisher Scientific Inc. Volume da célula de extração: 22 mL. Quantidade de alecrim por experimento: 1 g por célula.
		Etanol	50	20	100	137,48	Herrero et al., 2010	Origem da amostra: Múrcia, Espanha. Equipamento de extração: Extrator de solvente acelerado equipado com controlador de solvente. Volume da célula de extração: 11 mL. Quantidade de amostra: 1 g de amostra por célula.
Carnosol		71,3% Etanol	35.3	20.3	atm	5,10	Xie et al., 2023	Origem da amostra: Hunan, China. Equipamento de extração: Extrator ultrassônico com potência de 225,4 W. Quantidade de alecrim por experimento: 10 g. Volume de etanol-água: 130 mL.
	UAE	60% Etanol	22	70	atm	16,10	Psarrou et al., 2020	Origem da amostra: Kilkis, Grécia. Equipamento de extração: Banho ultrassônico equipado com frequência ultrassônica de 37 kHz. Condições: Temperatura de 22 °C. Quantidade de alecrim por experimento: 5 g. Razão sólido-solvente: 1:20.
		80% Etanol	51	10	atm	94,50	Irakli et al., 2023	Origem da amostra: Atenas, Grécia. Equipamento de extração: Extrator ultrassônico com gerador GM 4200. Condições: Frequência de 20 kHz. Quantidade de alecrim por experimento: 25 g. Volume da mistura etanol-água: 20 mL.

Table 2. (Continuação)

Composto	Técnica de extração	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressão (bar)	mg composto /g extrato	Referências	Condições extração
Carnasol		Hexano e acetato de etila	-	720	atm	21,50	Kontogianni et al., 2013	Origem da amostra: Amostra comercial de <i>R. officinalis</i> . Solventes: Dois solventes com polaridade crescente. Extração: 6 horas para cada solvent.
	SE	Metanol	70	360	atm	22,00	Sharma et al., 2020	Origem da amostra: Iowa, EUA. Quantidade de alecrim por experimento: 10 g. Razão sólido-solvente: 1:25.
		70% Ethanol	-	240	atm	102,39	Irakli et al., 2023	Origem da amostra: Atenas, Grécia. Quantidade de alecrim por experimento: 5 g. Razão sólido-solvente: 1:25.
Ácido Rosmarínico		Etanol	100	20	100	16,00	Herrero et al., 2010	Origem da amostra: Múrcia, Espanha. Equipamento de extração: Extrator de solvente acelerado equipado com controlador de solvente. Volume da célula de extração: 11 mL. Quantidade de amostra: 1 g de amostra por célula.
	PLE	59% Etanol	125	7	103.4	33,55	Irakli et al., 2023	Origem da amostra: Atenas, Grécia. Equipamento de extração: Extrator de solvente acelerado Thermo Fisher Scientific Inc. Volume da célula de extração: 22 mL. Quantidade de alecrim por experimento: 1 g por célula.
	UAE	71.3% Etanol	35.3	20.3	atm	14,90	Xie et al., 2023	Origem da amostra: Hunan, China. Equipamento de extração: Extrator ultrassônico com potência de 225,4 W. Quantidade de alecrim por experimento: 10 g. Volume de etanol-água: 130 mL.
		Metanol	50	120	atm	15,94	Sharma et al., 2020	Origem da amostra: Iowa, EUA. Equipamento de extração: Extrator ultrassônico em unidade de banho ultrassônico. Condições: Frequência de 40 kHz. Quantidade de alecrim por experimento: 10 g. Volume de etanol: 100 mL.

Tabela 2. (Continuação)

Composto	Técnica de extração	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressão (bar)	mg composto /g extrato	Referências	Condições extração
	UAE	60% Acetona	22	70	atm	16,60	Psarrou et al., 2020	Origem da amostra: Kilkis, Grécia. Equipamento de extração: Banho ultrassônico equipado com frequência ultrassônica de 37 kHz. Condições: Temperatura de 22 °C. Quantidade de alecrim por experimento: 5 g. Razão sólido-solvente: 1:20.
		80% Etanol	51	10	atm	53,91	Irakli et al., 2023	Origem da amostra: Atenas, Grécia. Equipamento de extração: Extrator ultrassônico com gerador GM 4200. Condições: Frequência de 20 kHz. Quantidade de alecrim por experimento: 25 g. Volume da mistura etanol-água: 20 mL.
Ácido Rosmarínico		Hexano e acetato de etila	-	720	atm	11,60	Kontogianni et al., 2013	Origem da amostra: Amostra comercial de <i>R. officinalis</i> . Solventes: Dois solventes com polaridade crescente. Extração: 6 horas para cada solvente.
	SE	Metanol	70	360	atm	33,49	Sharma et al., 2020	Origem da amostra: Iowa, EUA. Quantidade de alecrim por experimento: 10 g. Razão sólido-solvente: 1:25.
		70% Etanol	-	240	atm	51,40	Irakli et al., 2023	Origem da amostra: Atenas, Grécia. Quantidade de alecrim por experimento: 5 g. Razão sólido-solvente: 1:25.
Ácido Ursólico		Metanol	50	120	atm	1,04	Sharma et al., 2020	Origem da amostra: Iowa, EUA. Equipamento de extração: Extrator ultrassônico em unidade de banho ultrassônico. Condições: Frequência de 40 kHz. Quantidade de alecrim por experimento: 10 g. Volume de etanol: 100 mL.
	UAE	90% Etanol	60	10	atm	15,80	Bernatoniene et al., 2016	Origem da amostra: Hunan, China. Equipamento de extração: Extrator ultrassônico com potência de 225,4 W. Quantidade de alecrim por experimento: 10 g. Volume de etanol-água: 130 mL.
		90% Etanol	30	40	atm	35,30	Jacotet-Navarro et al., 2015	Origem da amostra: Marrocos. Equipamento de extração: Ultrassom aplicado ao sistema por meio de uma sonotrode. Condições: Amostras colocadas em um reator de jaqueta dupla junto com o solvente, ultrassom com potência de 1 kW. Razão sólido-solvente: 1:20.

Tabela 2. (Continuação).

Composto	Técnica de extração	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressão (bar)	mg composto /g extrato	Referências	Condições extração
Ácido Ursólico	SE	Methanol	70	360	atm	5,14	Sharma et al., 2020	Origem da amostra: Iowa, EUA. Quantidade de alecrim por experimento: 10 g. Razão sólido-solvente: 1:25.
		Hexano e acetato de etila	-	720	atm	190,10	Kontogianni et al., 2013	Origem da amostra: Amostra comercial de <i>R. officinalis</i> . Solventes: Dois solventes com polaridade crescente. Extração: 6 horas para cada solvent.
Ácido Oleonólico	SE	Hexano e acetato de etila	-	720	atm	89,70	Kontogianni et al., 2013	Origem da amostra: Amostra comercial de <i>R. officinalis</i> . Solventes: Dois solventes com polaridade crescente. Extração: 6 horas para cada solvent.
	PLE	Água	50	20	100	0,81	Herrero et al., 2010	Origem da amostra: Múrcia, Espanha. Equipamento de extração: Extrator de solvente acelerado equipado com controlador de solvente. Volume da célula de extração: 11 mL. Quantidade de amostra: 1 g de amostra por célula.
Ácido Cafeico	SFE	CO ₂ + 7% Etanol	40	300	150	0,07	Herrero et al., 2010	Origem da amostra: Múrcia, Espanha. Equipamento de extração: Extrator de fluidos supercríticos em escala piloto. Quantidade de alecrim por experimento: 0,5 kg. Taxa de fluxo de CO ₂ : 60 g/min.
	SE	Metanol	70	360	atm	0,04	Sharma et al., 2020	Origem da amostra: Iowa, EUA. Quantidade de alecrim por experimento: 10 g. Razão sólido-solvente: 1:25.

SFE: Extração com fluidos supercríticos. PLE: Extração por líquido pressurizado. UAE: Extração assistida por ultrassom. MAE: Extração assistida por micro-ondas. SE: Extração soxhlet.

Fonte: A autora (2026).

A fração não volátil do extrato de alecrim é predominantemente composta por diterpenos, principalmente ácido carnósico e carnosol, sendo o ácido carnósico o composto mais abundante, apresentando os maiores valores em todos os métodos avaliados, alcançando até 403,04 mg/g. No entanto, o método Soxhlet apresentou um valor de extração significativamente menor (2,91 mg/g), sugerindo uma menor eficiência na extração

desse composto em comparação com outras técnicas. O carnosol, que ocupa a segunda posição em termos de quantidade, apresentou valores de até 226,20 mg/g no método SFE, contudo, Del Pilar Sanchez-Camargo et al. (2014) relataram resultados bastante divergentes para essa técnica sob condições operacionais similares (45,61 mg/g).

Em relação aos triterpenos, um valor expressivo de 89,70 mg/g foi encontrado para o ácido oleanólico, embora esse composto raramente seja quantificado em estudos, o que limita uma análise mais detalhada sobre sua presença em extratos de alecrim. O ácido ursólico apresentou considerável variabilidade, tanto entre os diferentes métodos quanto dentro do mesmo método, com valores mostrando flutuações significativas. Essa variabilidade sugere que fatores como condições operacionais, tempo de extração e natureza da amostra podem influenciar substancialmente a quantidade desse composto, destacando a necessidade de um melhor entendimento dos parâmetros que afetam sua extração. O principal ácido fenólico presente no extrato de alecrim é o ácido rosmarínico, com valores variando de 11,60 a 53,91 mg/g, demonstrando uma concentração significativa desse composto.

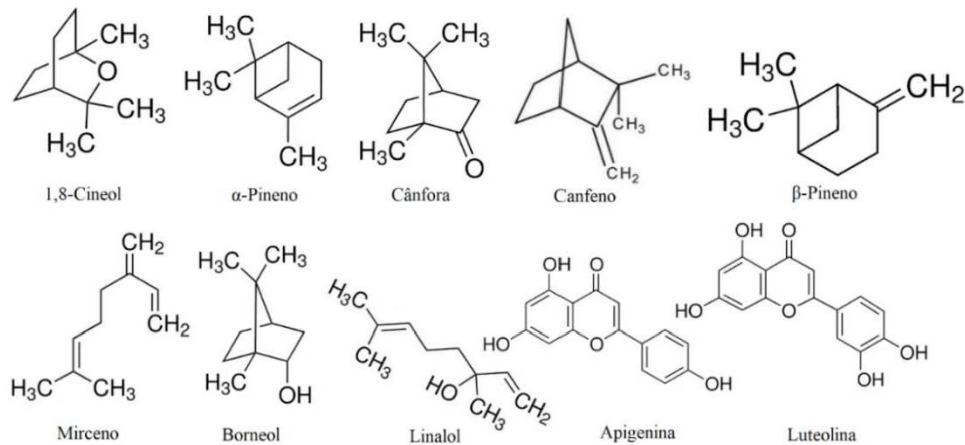
Por fim, a análise comparativa dos métodos de extração revela que diferentes técnicas influenciam significativamente a composição química do extrato de alecrim. A variação nas concentrações dos compostos analisados reflete a complexidade das interações entre a matriz vegetal e as condições de extração, ressaltando a importância de otimizar esses processos para maximizar a recuperação de compostos bioativos. A diversidade nos resultados também sugere que a escolha do método de extração deve ser cuidadosamente considerada, dependendo dos compostos-alvo e da aplicação desejada para o extrato.

3.5 COMPOSTOS BIOATIVOS E SUAS AÇÕES ANTICANCERÍGENAS

3.5.1 Compostos voláteis e suas ações anticancerígenas

O óleo essencial de alecrim é caracterizado por uma alta concentração de monoterpenos, incluindo 1,8-cineol, α -pineno, cânfora, canfeno, β -pineno, mirceno, borneol e linalol, além de flavonoides como apigenina e a luteolina (Figura 13).

FIGURA 13 - PRINCIPAIS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM



FONTE: Sigma-Aldrich, 2024.

Os compostos 1,8-cineol, α -pineno, cânfora e borneol se destacam devido ao seu peso molecular predominante. Esses mesmos compostos possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagênicas e antiproliferativas significativas, contribuindo para os efeitos anticâncer do óleo (Di Martile et al., 2020).

Os compostos voláteis presentes no óleo essencial de alecrim promovem a morte celular programada (apoptose) em células cancerígenas por meio de diversas vias. Compostos chave, como 1,8-cineol e α -pineno, atuam ativando proteínas pró-apoptóticas e inibindo proteínas anti-apoptóticas, o que leva à indução da apoptose pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e pela modulação de vias de sinalização apoptóticas (Lešnik, Furlan e Bren, 2021; Huang et al., 2024). Ainda, os compostos 1,8-cineol e cânfora induzem a parada do ciclo celular, prevenindo a replicação descontrolada de células malignas (Di Martile et al., 2020). A sua atividade antioxidante é mediada pela neutralização de radicais livres e pela indução de enzimas antioxidantes, reduzindo o estresse oxidativo, um fator crítico no desenvolvimento do câncer (Sharma et al., 2022).

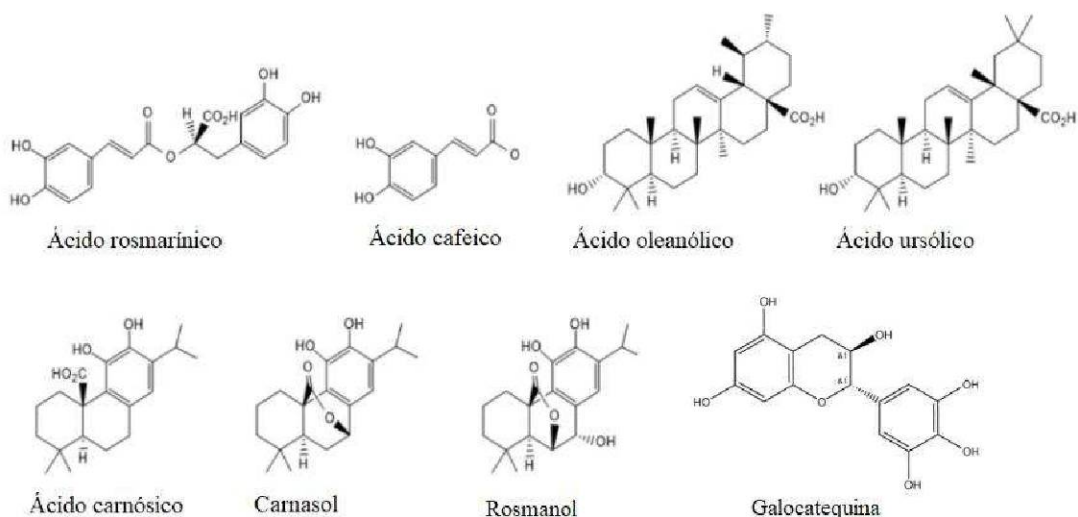
Adicionalmente, os compostos voláteis presentes no óleo essencial de alecrim tem a capacidade de inibir a invasão e a migração de células cancerígenas, além de suprimir a angiogênese tumoral. Isso é alcançado através da modulação de vias de sinalização que regulam a adesão celular, a motilidade e a formação de vasos sanguíneos (Di Martile et al., 2020). Monoterpenos como 1,8-cineol e α -pineno demonstram efeitos anti-inflamatórios significativos ao inibir a produção de citocinas e enzimas pró-inflamatórias, reduzindo a inflamação e prevenindo a criação de um microambiente tumoral favorável à progressão do câncer (Lešnik, Furlan e Bren, 2021).

É importante destacar que as propriedades anticâncer não dependem exclusivamente dos seus principais constituintes do óleo. A eficácia anticâncer pode ser amplificada por compostos menores e pela interação sinérgica entre os diferentes constituintes presentes, otimizando a capacidade de intervir em múltiplas vias celulares associadas ao desenvolvimento e à progressão do câncer (El Sala et al., 2024).

3.5.2 Compostos não voláteis e suas ações anticancerígenas

Os compostos fenólicos não voláteis presentes no alecrim, incluindo ácido carnósico, carnosol, rosmanol, ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido oleanólico, ácido ursólico e galocatequina, demonstram uma eficácia anticâncer significativa (Figura 14) (Bouammali et al., 2023). Esses compostos bioativos possuem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antiproliferativas, que atuam na inibição da formação de tumores, induzem a parada do ciclo celular e desencadeiam mecanismos de apoptose e autofagia. Além disso, esses compostos interferem nas vias de transdução de sinais celulares relacionados ao câncer (Aziz et al., 2022; Petiwala e Johnson, 2015; Fujii et al., 2013). A Figura 14 ilustra esses compostos bioativos, que foram identificados como promissores para a prevenção e tratamento de vários tipos de câncer, incluindo carcinoma, leucemia, câncer de mama, próstata, pulmão e fígado, entre outros (Aziz et al., 2022; Petiwala; Johnson, 2015; Bouammali et al., 2023).

FIGURA 14 - PRINCIPAIS COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS DO EXTRATO DE ALECRIM



FONTE: Adaptado de Bouammali, 2023 e Sigma-Aldrich, 2024.

3.5.2.1 Ácido carnósico

O ácido carnósico, um diterpeno fenólico raro nas espécies da família Lamiaceae, é o principal composto fenólico encontrado no alecrim (Birtić et al., 2015). Possui fórmula química $C_{20}H_{28}O_4$ e sua estrutura inclui três anéis de seis membros. Devido à sua configuração, o ácido carnósico é instável em solução e pode ser oxidado para formar carnosol (Sirajudeen et al., 2024; Selvamuthukumar e Shi, 2017; Petiwala e Johnson, 2015; Birtić et al., 2015). Juntamente com o carnosol, o ácido carnósico é responsável por cerca de 90% da capacidade antioxidante do extrato de alecrim (Petiwala e Johnson, 2015; Bouammali et al., 2023).

No alecrim, o ácido carnósico é predominantemente encontrado nos cloroplastos, concentrando-se principalmente nas folhas, mas também presente em sépalos e pétalas, com a maior concentração observada nas folhas (Bouammali et al., 2023; Sirajudeen et al., 2024; Aziz et al., 2022). Nas plantas, ele desempenha um papel crucial na proteção dos cloroplastos contra danos oxidativos provocados por estresses ambientais (Sirajudeen et al., 2024; Birtić et al., 2015).

Nas células cancerígenas, o ácido carnósico exibe propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anticâncer. Ele previne o crescimento celular reduzindo o estresse oxidativo e a inflamação. Além disso, o ácido carnósico induz a apoptose em células cancerígenas e limita seu crescimento por meio de efeitos antiangiogênicos, enquanto não afeta células normais (Selvamuthukumar e Shi, 2017; Sirajudeen et al., 2024; Min, Jung e Know, 2014).

3.5.2.2 Carnosol

O carnosol é um diterpeno fenólico dietético, solúvel em diversos solventes orgânicos, com a fórmula empírica $C_{20}H_{28}O_4$ e estrutura contendo um anel lactona. Ele é formado pela oxidação do ácido carnósico e possui propriedades notáveis promotoras à saúde, incluindo atividade anti-inflamatória, antioxidante e anticancerígena (Karagianni et al., 2022). Devido a essas propriedades, o carnosol tem sido objeto de extensas pesquisas em diversos tipos de câncer, como pulmão, cólon, mama, pâncreas, próstata, leucemia, cérebro e pele (Petiwala e Johnson, 2015; Johnson, 2011; O'Neill, 2020). Estudos indicam que o carnosol é bem tolerado em ensaios de toxicidade de curto e longo prazo e pode ser administrado por diferentes vias (Johnson, 2011).

Como agente anticancerígeno, o carnosol atua através de múltiplos mecanismos. Ele inibe a proliferação celular, migração, invasão e metástase de células cancerígenas, além de

induzir autofagia e apoptose (Petiwala; Johnson, 2015; Alsamri et al., 2021). O câncer é uma doença multifásica, compreendendo os estágios de iniciação, promoção e progressão. O carnosol se destaca como um agente quimiopreventivo eficaz por sua capacidade de interferir em múltiplos estágios do desenvolvimento do câncer (Petiwala e Johnson, 2015).

3.5.2.3 Rosmanol

O rosmanol é um diterpeno fenólico com fórmula empírica $C_{20}H_{26}O_5$, produzido pela oxidação do ácido carnósico, semelhante ao carnosol, e apresenta uma estrutura com anel lactona (Chan, Wong e Chan, 2021). Este composto não apenas exibe propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, mas também possui um efeito citotóxico significativo. A indução de apoptose pelo rosmanol em células é mediada pela ativação de caspases e envolve a regulação tanto da via apoptótica mitocondrial quanto da via extrínseca (Cheng et al., 2011).

3.5.2.4 Ácido rosmarínico

O ácido rosmarínico é um ácido fenólico hidroxilado solúvel em água, com fórmula química $C_{18}H_{16}O_8$, originado pela esterificação do ácido cafeico e do ácido 3,4-di-hidroxifenil-láctico (Radziejewska et al., 2018). Predominante nas folhas de alecrim, o ácido rosmarínico possui notáveis propriedades antivirais (Tsukamoto, 2018), antioxidantes (Matejczyk et al., 2018) e anticancerígenas (Moore, Yousef e Tsiani, 2016). Suas atividades biológicas incluem a indução da morte celular programada (apoptose), a inibição da formação e crescimento de tumores e a redução da disseminação do câncer (Matejczyk et al., 2018).

O ácido rosmarínico atua através de múltiplos mecanismos anticancerígenos. Ele induz a apoptose por ativação de caspases, reduz o crescimento tumoral por inibição da angiogênese (Bouammali et al., 2023; Radziejewska et al., 2018), e provoca a interrupção do ciclo celular e a inibição da proliferação de células cancerígenas (Matejczyk et al., 2018). Além disso, o ácido rosmarínico influencia a regulação epigenética ao alterar padrões de expressão gênica que modulam a progressão do câncer (Bouammali et al., 2023; Radziejewska et al., 2018).

3.5.2.5 Ácido cafeico

O ácido cafeico é um composto fenólico com fórmula química $C_9H_8O_4$, sintetizado por todas as espécies vegetais através de seus metabolismos secundários. Embora esteja presente em concentrações relativamente baixas nas células vegetais, desempenha papéis essenciais na

defesa contra predadores, como fungos e bactérias, devido às suas propriedades antimicrobianas, e na proteção das folhas contra a radiação ultravioleta B (UV-B) (Espíndola et al., 2019; Swisłocka, 2013). Além de suas atividades antimicrobianas, o ácido cafeico é reconhecido por suas propriedades antitumorais, antivirais, anti-inflamatórias e antioxidantes (Swisłocka, 2013).

No contexto da quimioprevenção, o ácido cafeico se destaca como um agente promissor e um adjuvante emergente para a quimioterapia do câncer. Devido aos efeitos adversos graves e à geração de quimiorresistência associados a muitos agentes anticâncer, a combinação do ácido cafeico com medicamentos quimioterápicos pode produzir efeitos sinérgicos no tratamento do câncer. Essa interação pode levar à indução da apoptose, à redução da dose de fármacos utilizados e ao aumento da eficácia da quimioterapia (Matejczyk et al., 2018; Koraneekit et al., 2018; Koraneekit et al., 2016).

3.5.2.6 Ácido oleanólico

O ácido oleanólico, com fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$, é um triterpenoide pentacíclico amplamente encontrado no reino vegetal. Este composto destaca-se por suas propriedades farmacológicas variadas, incluindo hepatoproteção, ação anti-inflamatória, atividade antioxidante e, de forma proeminente, potencial anticancerígeno. As propriedades estéricas do metil exocíclico e de outros grupos funcionais presentes nos triterpenoides naturais conferem ao ácido oleanólico e seus derivados um grande potencial terapêutico. Devido ao crescente interesse em sua aplicação clínica, modificações químicas em sua estrutura têm sido realizadas para melhorar a potência, reduzir a toxicidade e aumentar a biodisponibilidade e solubilidade do composto (Baer-Dubowska, Narożna e Krajka-Kuźniak, 2021; Ayeleso, Matumba e Mukwevho, 2017).

O ácido oleanólico compartilha com outros compostos fenólicos mecanismos anticancerígenos, incluindo a inibição do crescimento e proliferação de células cancerígenas, a indução da apoptose e autofagia de células tumorais, e a modulação epigenética, que pode atuar como um adjuvante na imunoterapia ou terapia anticâncer (Lu et al., 2021; Bao et al., 2020). Além disso, o ácido oleanólico tem mostrado capacidade de formar nanopartículas esféricas para encapsulamento e entrega de medicamentos, proporcionando uma abordagem inovadora para atingir múltiplas vias de sinalização. Essas nanopartículas não apenas atuam como transportadores, mas também possuem atividade antitumoral própria, ampliando seu potencial terapêutico (Bao et al., 2020).

3.5.2.7 Ácido ursólico

O ácido ursólico, presente em uma ampla variedade de vegetais, frutas, flores e plantas, é um triterpeno pentacíclico com fórmula química $C_{30}H_{48}O_3$, solúvel em etanol e pouco solúvel em água (Seo et al., 2018; Panda, Thangaraju e Lokeshwar, 2022; Kashyap, Tuli e Sharma, 2016; Jäger et al., 2009). Este composto é amplamente estudado devido à sua vasta gama de atividades biológicas, destacando-se principalmente por suas propriedades anticancerígenas, neuroprotetoras, anti-inflamatórias e antioxidantes (Kashyap e Tuli e Sharma, 2016).

A atividade anticancerígena do ácido ursólico está intrinsecamente ligada à sua capacidade de modular o sistema de defesa antioxidante e regular as vias de sinalização pró-inflamatórias. Este ácido é eficaz na desativação de mediadores inflamatórios nas células, desempenhando um papel crucial na mitigação da inflamação, que é um fator chave no desenvolvimento e progressão do câncer. A inflamação persistente pode causar danos aos tecidos e órgãos, tornando a eficácia anti-inflamatória do ácido ursólico especialmente relevante (Alam et al., 2021; Kashyap, Tuli e Sharma, 2016).

O ácido ursólico demonstra propriedades anticancerígenas robustas contra diversos tipos de câncer, incluindo a inibição do crescimento celular, migração e invasão de células cancerígenas, bem como a indução da apoptose e a supressão da proliferação celular. Seu mecanismo também interfere na angiogênese tumoral através de múltiplas vias de sinalização. Considerando que o progresso do câncer é mediado pela comunicação complexa entre várias vias de sinalização, a capacidade do ácido ursólico em inibir múltiplas dessas vias reforça seu potencial como um agente quimiopreventivo e terapêutico (Zhang et al., 2019; Seo et al., 2018; Kashyap, Tuli e Sharma, 2016).

3.5.2.8 Galocatequina

A galocatequina, com fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_7$, é amplamente reconhecida como um dos principais flavonoides presentes nos extratos de alecrim. Os flavonoides desempenham um papel crucial no mecanismo de defesa química das plantas, por exemplo, a galocatequina pode ser liberada pelas plantas em resposta a ataques fúngicos (Hammerbacher et al., 2018). A galocatequina é frequentemente identificada em estudos sobre o alecrim e pode também ser referida como epigalocatequina, conforme a curva de calibração devido à sua semelhança estrutural com este composto (Borrás-Linares et al., 2014).

Como agente anticancerígeno, a galocatequina demonstra atividade citotóxica notável. Seus efeitos anticancerígenos são mediados principalmente por dois mecanismos: a indução da parada do ciclo celular e a ativação de caspases, que promovem a morte celular programada (Fujii et al., 2013). Esses mecanismos contribuem significativamente para a eficácia da galocatequina na luta contra células cancerígenas, sublinhando seu potencial terapêutico na prevenção e tratamento do câncer.

A Quadro 3 resume as principais características e mecanismos de ação anticancerígena dos compostos não voláteis do alecrim destacados no texto.

QUADRO 3 - COMPARAÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS DO ALECRIM E SUAS AÇÕES ANTICANCERÍGENAS

Composto Não Volátil	Tipo / Origem	Fórmula Química	Principais Ações / Mecanismos Anticancerígenos
Ácido Carnósico	Diterpeno Fenólico. Principal composto fenólico do alecrim. Precursor do carnosol.	$C_{20}H_{28}O_4$	Induz a apoptose, limita o crescimento por efeitos antiangiogênicos. Reduz o estresse oxidativo e a inflamação. Não afeta células normais.
Carnosol	Diterpeno Fenólico. Formado pela oxidação do ácido carnósico.	$C_{20}H_{28}O_4$	Atua como agente quimiopreventivo em múltiplos estágios do câncer. Inibe a proliferação, migração, invasão e metástase. Induz apoptose e autofagia.
Rosmanol	Diterpeno Fenólico. Produzido pela oxidação do ácido carnósico.	$C_{20}H_{26}O_5$	Efeito citotóxico significativo. Induz a apoptose mediada pela ativação de caspases (via intrínseca/mitocondrial e extrínseca)
Ácido Rosmarínico	Ácido Fenólico Hidroxilado (solúvel em água). Éster do ácido cafeico e ácido di-hidroxifenil-láctico.	$C_{20}H_{16}O_8$	Induz apoptose por ativação de caspases. Reduz o crescimento tumoral por inibição da angiogênese. Interrupção do ciclo celular e inibição da proliferação. Modulação epigenética.
Ácido Cafeico	Composto Fenólico. Sintetizado por todas as plantas.	$C_9H_8O_4$	Agente quimiopreventivo e adjuvante emergente para quimioterapia (efeitos sinérgicos). Indução de apoptose.
Ácido Oleanólico	Triterpenoide Pentacíclico.	$C_{30}H_{48}O_3$	Inibe o crescimento e proliferação. Induz a apoptose e autofagia. Modulação epigenética (adjuvante em imunoterapia). Potencial como nanopartícula de entrega e antitumoral.

Quadro 3. (Conclusão).			
Composto Não Volátil	Tipo / Origem	Fórmula Química	Principais Ações / Mecanismos Anticancerígenos
Ácido Ursólico	Triterpeno Pentacíclico (solúvel em etanol).	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	Modula o sistema de defesa antioxidante e regula vias pró-inflamatórias. Inibe o crescimento, migração e invasão. Induz apoptose. Supressão da proliferação e interferência na angiogênese.
Galocatequina	Flavonoide.	C ₁₄ H ₁₅ O ₇	Atividade citotóxica notável. Indução da parada do ciclo celular e ativação de caspases (morte celular programada).

FONTE: A autora (2026).

3.6 CENÁRIO ATUAL DO USO DE FITOQUÍMICOS NO TRATAMENTO DE CÂNCER

Ensaio clínicos relacionando fitoquímicos e câncer vêm ocorrendo há décadas, destacando compostos como a curcumina, berberina, epigallocatequina, licopeno e resveratrol (Choudhari et al., 2020; Garcia et al., 2023). Kuttan, Sudheeran e Josph (1987) por exemplo, conduziram pesquisas de 1984 a 1986 em pacientes com lesões cancerosas externas com uma pomada de curcumina e obtiveram efeitos notáveis. Garcea et al. (2005) em um estudo com 12 pacientes com câncer colorretal, que receberam cápsulas de curcumina (450, 1.800 ou 3.600 mg) por 7 dias, demonstrou que embora a curcumina ingerida oralmente tenha baixa disponibilidade, forneceu concentrações suficientes para causar alterações farmacodinâmicas proporcionais à quimioprevenção intestinal.

Dhillon et al. (2008) em ensaio de fase II com curcumina em pacientes com câncer de pâncreas avançado, avaliaram 25 pacientes que receberam 8 g de curcumina por via oral diariamente até a progressão da doença, com reposição a cada 2 meses, concluindo que dois pacientes apresentaram atividade clínica biológica, possui absorção limitada e é bem tolerada, não apresentando toxicidade. Golombick et al. (2015) avaliou a curcumina, em um estudo com 21 pacientes com leucemia linfocítica crônica em fase inicial, com dosagem diária via oral de 2 g, demonstrando atividade antitumoral em um subconjunto de participantes, com resposta biológica definida pela redução de mais de 20% na contagem absoluta de linfócitos em relação ao basal. Esse resultado sugere benefício potencial, embora limitado e dependente de protocolos específicos.

No entanto, os achados desses e demais ensaios precisam ser confirmados em ensaios maiores que avaliem segurança e eficácia, conforme indicado pelas conclusões dos artigos. Ainda, são ensaios que tiveram amostras pequenas, miraram vários estágios de câncer e populações de pacientes com câncer, e utilizaram diferentes formulações, doses de curcumina e durações de intervenção. Assim, as evidências atualmente são insuficientes para recomendar o uso de produtos contendo curcumina como complementos no tratamento do câncer (PDQ Integrative, Alternative, and Complementary Therapies Editorial Board, 2024).

Outros compostos fitoquímicos, como os compostos fenólicos, avançam nas pesquisas *in vitro* e *in vivo* com camundongos e ratos, mostrando resultados promissores em tratamento e prevenção (Kowalczyk et al., 2024; Lagoa et al., 2020; Choudhari et al., 2020). O perfil de segurança dos fitoquímicos oferece uma vantagem significativa em relação às terapias convencionais (Aljabali et al., 2025). Contudo, além dos desafios da definição de regimes de dosagem e condução de ensaios clínicos em grande escala, desafios relacionados aos métodos ótimos de extração e ao custo de desenvolvimento e produção na oncologia com fitoquímicos continuam sendo obstáculos significativos para cumprir as promessas dos fitoquímicos (Aljabali et al., 2025; Kowalczyk et al., 2024; Jia et al., 2023).

3.7 ANÁLISES DOS COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Os compostos fenólicos não voláteis são identificados e mensurados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), enquanto compostos voláteis são quantificados e mensurados por cromatografia gasosa (GC) (Mansur et al., 2022; Nazlić et al., 2020). Para a determinação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante por métodos de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria de amostras *in natura*, é necessário realizar uma extração com metanol na amostra seca. A solução obtida então é centrifugada, filtrada e armazenada para as análises (Sadowska et al., 2017; Nazlić et al., 2020).

Para análise em cromatografia gasosa (GC), o óleo essencial deve ser diluído em solventes não reativos e voláteis, como hexano ou cloroformio (González-Rivera et al., 2016; Ribeiro et al., 2020). Para a determinação da atividade antioxidante por espectrofotometria, o óleo essencial também é diluído em solventes específicos, conforme as exigências de cada método de análise (Nazlić et al., 2020).

Após a etapa de extração dos compostos não voláteis, o solvente contendo os compostos bioativos é separado do resíduo sólido utilizando técnicas de filtração como filtração a vácuo ou centrifugação. O solvente contendo os compostos bioativos extraídos é então

concentrado para aumentar o conteúdo fenólico utilizando técnicas como evaporação rotativa ou liofilização. O extrato concentrado é analisado por meio de técnicas analíticas como cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria para quantificar os compostos bioativos e sua capacidade antioxidante (Shi et al., 2022; Cabana et al., 2013).

O conteúdo do hidrolato e da água residuárias resultante da extração, ou o conteúdo subsequente de uma nova extração desses subprodutos podem ser analisados pela capacidade antioxidante em espectrofotômetro por meio de técnicas analíticas como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa (GC) (Nazlić et al., 2020; Valente et al., 2024; Cabana et al. 2013).

3.7.1 Método GC-MS - Perfil fenólico

Durante a última década, a cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) tornou-se a técnica analítica mais amplamente utilizada para a identificação de componentes voláteis e semivoláteis presentes em tecidos vegetais. Devido às suas capacidades qualitativas rápidas e quantitativas precisas, facilidade de operação e bom desempenho de extração (Niu et al., 2024; Cárdenas-Valdovinos et al., 2023; Shi et al., 2022).

No método GC-MS, cada uma das suas partes realiza um determinado processo analítico, a cromatografia a gás (GC) realiza a separação dos componentes da mistura gasosa analisada pela afinidade dos compostos que afetam as interações dos compostos com as fases móvel e estacionária. Já a espectrometria de massas (MS), realiza a identificação dos componentes químicos gasosos separados ao converter as moléculas para um estado ionizado. Ao converter as moléculas para um estado ionizado, com base em sua razão massa/carga (m/z), os espectrômetros de massa podem analisar os íons e quaisquer íons de fragmento que são produzidos durante o processo de ionização. O GC-MS gera um cromatograma que mostra os picos correspondentes aos diferentes compostos na amostra ao longo do tempo, cada pico no cromatograma tem um espectro de massas associado, que pode ser comparado com bibliotecas de espectros conhecidos para identificar os compostos (Shi et al., 2022; Ajilogba; Babalola, 2019).

3.7.2 Método HPLC-MS - Perfil fenólico

Entre as diversas técnicas de análise qualitativa e quantitativa dos compostos fenólicos, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é amplamente utilizada. Para aprimorar a

sensibilidade desses métodos analíticos, detectores avançados são frequentemente acoplados ao HPLC, sendo o detector de massa sequencial (MS) uma das opções mais eficazes (Mansur et al., 2022). No sistema HPLC, o detector é responsável por converter um atributo físico ou químico em um sinal mensurável, que corresponde à identidade e/ou concentração do analito. Detectores avançados, como o MS, são particularmente úteis para determinar os padrões de fragmentação dos íons. Sua alta sensibilidade e seletividade tornam a análise de compostos fenólicos em baixas concentrações, presentes em extratos vegetais, mais precisa e eficiente (Mansur et al., 2022).

3.7.3 Método FC - Compostos fenólicos totais

A análise espectrofotométrica utilizando o método Folin-Ciocalteu (FC) é uma técnica conveniente e simples, que requer apenas equipamentos comuns e gera dados comparáveis (Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós, 1999). Esse ensaio é projetado para medir todos os compostos facilmente oxidáveis nas condições de reação e é geralmente preferido para quantificar fenólicos em extratos vegetais ricos em polifenóis com propriedades antioxidantes (Kalpoutzakis et al., 2023). O conteúdo total de fenólicos é determinado com base em uma curva padrão de ácido gálico. A absorbância das amostras é medida em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 760 nm, e o valor obtido é expresso em equivalentes de ácido gálico por grama de biomassa seca dos extratos (Kalpoutzakis et al., 2023).

3.7.4 Método DPPH - Capacidade antioxidante

A simplicidade do procedimento, o curto tempo de reação e a alta reatividade dos compostos fenólicos com o radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) contribuíram para a popularidade do método DPPH. A atividade antioxidante é avaliada com base na capacidade dos antioxidantes de neutralizar os radicais DPPH, medindo-se a mudança espectrofotométrica associada a essa reação (Angeli e Morozova, 2023). A reação resulta na mudança de cor do radical DPPH, que passa de roxo para amarelo devido à redução do átomo de nitrogênio no DPPH pela doação de um átomo de hidrogênio ou elétron dos antioxidantes. A medição espectrofotométrica do desaparecimento da cor violeta é realizada a um comprimento de onda de 517 nm, durante um intervalo de tempo fixo (30-60 min). A atividade antioxidante total é calculada como a diferença na absorção da solução do radical DPPH antes e após a reação com o antioxidante (Gulcin e Alwasel, 2023; Flieger e Flieger, 2020). Devido

à possível reação do oxigênio molecular com o DPPH na presença de luz, o ensaio deve ser realizado em ambiente escuro para preservar os compostos reativos na solução e no reagente (Gulcin e Alwassel, 2023).

Os resultados da capacidade de remoção dos radicais DPPH são expressos como a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox. Para isso, determina-se a atividade de remoção de radicais da solução padrão de Trolox em diferentes concentrações, elaborando-se uma curva de calibração (Gulcin e Alwassel, 2023).

3.7.5 Método FRAP - Capacidade antioxidante

Com baixo custo, sensibilidade e rapidez, o ensaio de poder antioxidante redutor férrico (FRAP) é uma técnica valiosa para investigar a atividade antioxidante de ácidos fenólicos. O método FRAP baseia-se na redução do complexo férrico de tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ), que é incolor, para o complexo ferroso de tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ), que possui uma cor azul intensa, em resposta ao potencial antioxidante da amostra. A formação do complexo azul é monitorada espectrofotometricamente a 593 nm (Spiegel et al., 2020; Zorić et al., 2021).

Para a construção da curva de calibração, são necessárias soluções preparadas imediatamente com concentrações conhecidas de sulfato ferroso e reagente FRAP. O método FRAP avalia diretamente a capacidade dos antioxidantes de reduzir espécies oxidativas, permitindo uma comparação direta da atividade antioxidante entre diferentes amostras. Os resultados são expressos como equivalentes de miligrama de Fe^{2+} por miligrama de peso seco da planta (Spiegel et al., 2020; Fejér et al., 2022).

3.7.6 Método ORAC - Capacidade antioxidante

O ensaio de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) é um método amplamente utilizado para medir a capacidade antioxidante de diversas amostras biológicas e é aplicável a antioxidantes mesmo na ausência de uma fase de latência pronunciada. O método ORAC avalia a inibição da oxidação induzida pelo radical peroxil, gerado pelo iniciador de radical livre AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina)), pelos antioxidantes, refletindo assim a atividade antioxidante clássica de quebra da cadeia radical por transferência de átomo de hidrogênio (Asma et al., 2024; Gunawardena, Silva e Ranasinghe, 2019).

Antioxidantes eficazes inibem o decaimento da fluorescência, resultando em sinais de fluorescência que permanecem detectáveis por períodos mais longos. A intensidade da

fluorescência é registrada utilizando um espectrofotômetro de fluorescência com leitor de placas, monitorando continuamente o decaimento da fluorescência em intervalos específicos e em comprimentos de onda determinados para excitação e emissão (Asma et al., 2024; Gunawardena, Silva e Ranasinghe, 2019). A capacidade antioxidante total é quantificada pelo índice de área sob a curva (AUC), que permite uma avaliação prática da atividade antioxidante contra o radical peroxil em comparação com a curva padrão do análogo de vitamina E solúvel em água, Trolox (Gunawardena, Silva e Ranasinghe, 2019). Alternativamente, a modelagem cinética pode ser utilizada para uma análise mais detalhada da dinâmica da reação entre antioxidantes e espécies radicais (Asma et al., 2024).

O Quadro 4 compila as características, vantagens, desvantagens e precisão dos principais métodos analíticos descritos para a identificação e quantificação de compostos bioativos e avaliação da capacidade antioxidante, com o objetivo de auxiliar na escolha da técnica mais viável em termos econômicos e técnicos.

QUADRO 4 - ANÁLISE E COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA PERFIL FENÓLICO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Método	Principais Compostos Analisados	Vantagens	Desvantagens	Precisão / Custo
GC-MS	Voláteis e Semivoláteis (ex: Terpenos e Terpenoides em Óleos Essenciais).	Qualitativa e Quantitativa rápida e precisa. Alta sensibilidade. Facilidade de operação.	Requer que o analito seja volátil. Alto custo de aquisição e manutenção.	Alta Precisão para voláteis. Custo Alto.
HPLC-MS	Compostos Não Voláteis (ex: Ácidos Fenólicos, Flavonoides).	Alta sensibilidade e seletividade. Ideal para compostos em baixas concentrações. Determina padrões de fragmentação de íons (identificação).	Custo elevado de aquisição e operação do equipamento (MS).	Alta Precisão e Confirmação Estrutural. Custo Alto.
Folin-Ciocalteu (FC)	Fenólicos Totais (todos os compostos facilmente oxidáveis).	Conveniente e simples. Requer apenas equipamentos comuns (espectrofotômetro). Baixo custo e dados comparáveis.	Não é seletivo (reage com outras substâncias redutoras). O resultado é uma estimativa (Expresso como Equivalente de Ácido Gálico - EAG).	Baixa Precisão (Não seletivo). Custo Baixo.

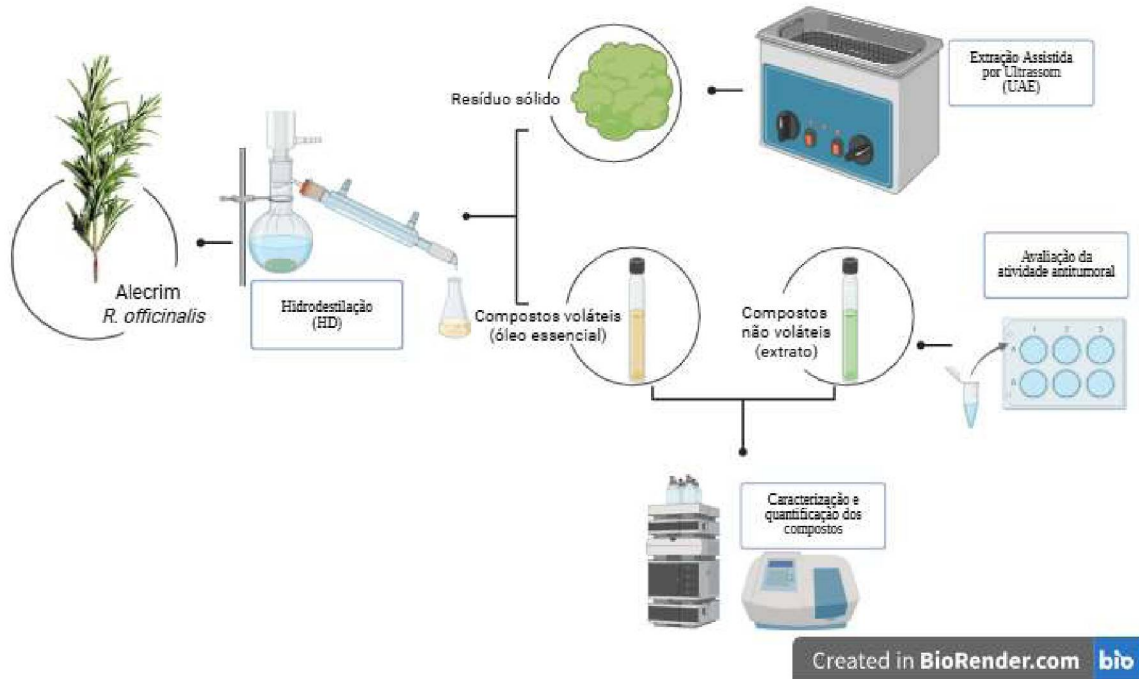
Quadro 4. (Conclusão)				
Método	Principais Compostos Analisados	Vantagens	Desvantagens	Precisão / Custo
DPPH	Capacidade Antioxidante Total (Mecanismo de Transferência de Átomo de Hidrogênio - HAT).	Simplicidade do procedimento. Curto tempo de reação.	Deve ser realizado no escuro. Sensível à luz e oxigênio (pode reagir com O ₂).	Média Precisão. Custo Baixo.
FRAP	Capacidade Antioxidante Total (Mecanismo de Poder Redutor - SET).	Baixo custo, sensível e rápido. Avalia diretamente a capacidade de redução.	Método seletivo, baseado na transferência de elétrons, não consegue detectar espécies que atuam por transferência de hidrogênio.	Média Precisão (Potencial Redutor). Custo Baixo.
ORAC	Capacidade Antioxidante Total (Mecanismo de Quebra de Cadeia Radical - HAT).	Mede a inibição da oxidação pelo radical peroxil (atividade antioxidante clássica). Aplicável a antioxidantes sem fase de latência.	Mais complexo que DPPH/FRAP. Requer espectrofotômetro de fluorescência (leitor de placas). Custo mais alto (reagentes e equipamento).	Alta Precisão (Relevância Biológica). Custo Médio/Alto

FONTE: A autora (2026).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para facilitar o entendimento das etapas e metodologias aplicadas no desenvolvimento deste trabalho, a Figura 16 apresenta um fluxograma com as atividades realizadas.

FIGURA 16 – FLUXOGRAMA DE ORGANIZAÇÃO E HIERARQUIA DAS ATIVIDADES REALIZADAS NO ESTUDO



Criado com BioRender.com

FONTE: A autora (2026).

4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS DE ALECRIM

Duas amostras de alecrim foram utilizadas para a extração do óleo essencial. A Amostra 1 (Figura 17a) foi colhida fresca em Chapecó, Santa Catarina, Brasil, em 18 de abril de 2025. No dia seguinte, as folhas foram separadas dos caules e, posteriormente, submetidas à secagem em estufa entre 22 e 23 de abril. Em 23 de abril, o material seco foi moído, porcionado em alíquotas de 100 g e embalado a vácuo.

A Amostra 2 (Figura 17b) foi adquirida em um empório de produtos naturais já processada. Esse material foi seco em estufa entre 12 e 13 de abril de 2025, moído e porcionado a vácuo em 15 e 16 de abril.

Ambas as amostras de alecrim foram secas em estufa (AmericanLab model AL - 102/480) a 60 °C por 24 horas. Em seguida, cada amostra foi moída em moinho de facas tipo Willye (AmericanLab model AL - 032S). Por fim, as amostras foram embaladas à vácuo em seladora a vácuo Centro DZ280 em porções de 100 gramas para realização dos ensaios de extração dos compostos voláteis. A extração em Clevenger da Amostra 2 foi realizada em 17 de abril de 2025 enquanto a extração em aparelho de Clevenger da Amostra 1 ocorreu no dia 24 e 25 abril de 2025.

FIGURA 17 – AMOSTRAS DE ALECRIM UTILIZADAS



a – Amostra fresca colhida em Chapecó-SC. **b** – Amostra adquirida em empório de produtos naturais

FONTE: A autora (2026).

4.2 EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS

A extração por hidrodestilação dos compostos voláteis (óleo essencial) foi realizada em um destilador para óleos essenciais do tipo Clevenger (Marconi - MA553/2000), acoplado a um chiller de água (Presioniqi CW5200DH) para garantir o resfriamento adequado durante o processo (Figura 18).

A hidrodestilação foi escolhida dentre os métodos apresentados para simular um processo industrial, pois o método é amplamente utilizado na extração de óleos essenciais em escala comercial. Isso se deve ao seu baixo custo, à facilidade de operação e à recuperação eficiente e estável dos compostos, resultando em um óleo essencial de alta qualidade (Olascuaga-Castillo et al., 2024; Hien et al., 2022).

FIGURA 18 – PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL EM DESTILADOR CLEVINGER ACOPLADO A CHILLER



A - Chiller de água. B – Hidrodestilador Clevernger. B1 - Sistema de aquecimento em bloco de cerâmica infravermelho tipo manta. B2- Balão de fundo redondo 500 mL. B3 - Tubo de interligação/condensador duplo. B4 – Válvula de drenagem.

FONTE: A autora (2026).

4.3 TESTES PRELIMINARES E DEFINIÇÃO DA AMOSTRA E CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO

Nos testes preliminares, avaliou-se o rendimento de óleo essencial extraído (mL/100g) ao longo de 4 horas pelo método de hidrodestilação, com o objetivo de comparar o desempenho das amostras. Para isso, 100 gramas da Amostra 1 e 100 gramas da Amostra 2 foram submetidas à hidrodestilação por 4 horas em destilador do tipo Clevernger, sendo monitorado o rendimento de óleo essencial obtido durante esse período. Com base nesses resultados, foi selecionada a amostra que apresentou maior rendimento.

Após a seleção da amostra com melhor desempenho, foram avaliados o rendimento do óleo essencial e a composição do perfil volátil em função do tempo de extração. Dessa forma, análises preliminares de rendimento de óleo essencial e composição do perfil volátil foram realizadas após 30 minutos e após 4 horas de extração.

Após a realização dos testes preliminares, foi selecionada a amostra e o tempo de extração por hidrodestilação que possibilitou maximizar o rendimento de óleo essencial, reduzir o consumo de energia e otimizar os recursos operacionais.

4.4 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DOS COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS

Para a obtenção dos compostos não voláteis, empregou-se o método de extração assistida por ultrassom. Essa técnica foi escolhida por ser uma tecnologia de extração ecologicamente correta, altamente eficiente e cada vez mais atraente para a indústria. Além disso, o uso do ultrassom permite explorar diferentes modos de operação e ajustar parâmetros de controle, favorecendo o aumento da eficiência e a redução de custos (Shen et al., 2023).

Para definir as melhores condições operacionais de extração assistida por ultrassom foi realizado um planejamento experimental completo 2^3 , apresentado na Tabela 3. Todas as condições advindas do planejamento fatorial foram realizadas tempo fixo de 120 minutos. Após as extrações assistidas por ultrassom, as condições foram quantificações para compostos fenólicos totais e avaliação da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e Folin-Ciocalteu.

TABELA 3 – PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^3 APLICADO NA EXTRAÇÃO POR ULTRASSOM

Número do ensaio	Temperatura (°C)	RSL (mg/mL)	Concentração de etanol (%)	Temperatura (°C)	RSL (mg/mL)	Concentração de etanol (%)
1	-1	-1	-1	30	20	20
2	1	-1	-1	70	20	20
3	-1	1	-1	30	60	20
4	1	1	-1	70	60	20
5	-1	-1	1	30	20	60
6	1	-1	1	70	20	60
7	-1	1	1	30	60	60
8	1	1	1	70	60	60
9	0	0	0	50	40	40

RSL: razão sólido-líquido

FONTE: A autora (2026).

4.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL VOLÁTIL DO ÓLEO ESSENCIAL

A determinação do perfil volátil do óleo essencial foi realizada em um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas do modelo GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Japão) com a metodologia adaptada de Tyagi e Malik (2012). A separação dos compostos foi conduzida utilizando coluna capilar, sob as seguintes condições cromatográficas: A temperatura

do injetor foi mantida a 260,0 °C e operado em modo de injeção Slipt (razão 10:1) e o gás hélio foi utilizado como gás de arraste. O forno de coluna foi inicialmente mantido a 50,0 °C por 2 min, elevado para 180 °C a 8 °C/min por 1 minuto e, em seguida, para 230 °C a 4 °C/min por 2 minutos. As temperaturas da interface foram ajustadas para 200 °C e 260 °C, respectivamente, e o modo de ionização foi o impacto de elétrons (70 eV). O detector seletivo de massa foi operado no modo de varredura entre 20 e 700 m/z com velocidade de varredura de 2.500 u/s. A aquisição de dados foi iniciada 4 minutos após a injeção e finalizada após 31 minutos de injeção. O índice de retenção (Retention Index, RI) dos compostos identificados foi calculado com base em padrão de n-alcenos (C9–C22).

4.6 DETERMINAÇÃO DO PERFIL NÃO VOLÁTIL DO EXTRATO

Os compostos não voláteis foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas, empregando um sistema Shimadzu LCMS-8050Rx, conforme metodologia descrita por Arruda et al. (2018), com modificações. A separação cromatográfica foi realizada em coluna Shim-pack GISS C18 (3 µm, 4,6 × 150 mm; Shimadzu). A fase móvel consistiu em ácido fórmico 0,3% (v/v) e metanol, operando em modo gradiente, com vazão de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura do forno mantida a 45 °C. O volume de injeção foi de 5 µL. O equipamento operou com fluxo de gás de nebulização de 3 L/min, fluxo de gás de aquecimento de 15 L/min e fluxo de gás de secagem de 5 L/min. As temperaturas estabelecidas foram de 400 °C para a interface, 200 °C para o DL e 500 °C para o bloco de aquecimento, mantendo-se essas condições constantes ao longo de toda a análise. Os compostos analisados incluíram 4-hidroxibenzidrazida, vanilina, flavona, ácido gálico, catequina, pirocatecol, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido sinápico, rutina, ácido ferúlico, miricetina, quercetina, kaempferol e ácido rosmarínico.

4.7 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método de Singleton e Joseph (1965), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Inicialmente, alíquotas de 20 µL do extrato foram adicionadas a 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu previamente diluído (1:10, v/v). Após 5 minutos de incubação em repouso, adicionaram-se 75 µL de solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 7,5% (m/v). A mistura reacional foi mantida ao abrigo da luz por 60 minutos para

desenvolvimento da coloração. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro de microplacas Thermo Scientific Multiskan FC, no comprimento de onda de 740 nm.

A concentração de fenóis foi determinada com base no equivalente em microgramas de ácido gálico equivalente ($C_7H_6O_5$) por grama de extrato, a partir de uma curva de calibração padrão preparada na faixa de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$ e branco controle.

4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

Utilizando a metodologia descrita por Brand-Williams e Berset (1995), a atividade antioxidante total foi determinada a partir da capacidade de inibição do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Inicialmente, foram adicionados 40 μL de extrato e 160 μL de DPPH (0,1 mmol/L) em um tubo de ensaio. Decorridos 60 minutos de repouso, foi realizado a leitura em espectrofotômetro microplacas (Thermo Scientific™ Multiskan™ FC) no comprimento de onda de 517 nm.

Os resultados foram expressos como microgramas de Trolox Equivalente por grama de extrato, a partir de uma curva de calibração padrão Trolox 1500 μM preparada na faixa de 0 a 50 $\mu\text{g/mL}$ e branco controle.

4.9 EVAPORAÇÃO DO ETANOL E LIOFILIZAÇÃO DO EXTRATO

A condição que estatisticamente apresentou melhor resultado em conteúdo fenólico total (CFT) e atividade antioxidante total (AAT) foi submetida novamente a extração assistida por ultrassom de acordo com as condições de seu planejamento experimental (Tabela 3), em volume suficiente para, posteriormente, realizar a evaporação do etanol, liofilização do extrato e a avaliação da atividade anticancerígena do extrato.

Dessa forma, após a extração assistida por ultrassom, o etanol presente no extrato foi evaporado por meio de um evaporador rotativo (Tecnal - TE 211). O processo foi conduzido até que a proporção de etanol adicionada inicialmente foi recuperada (cerca de 1 hora). Em seguida, as amostras foram congeladas completamente. Após o congelamento, as amostras foram submetidas a liofilização em liofilizador vertical (Solab SL - 404/AQ-B) em temperatura de -25°C e pressão de -710 mmHg, por um período de 50 horas, até que a massa atingisse um valor constante. Posteriormente o extrato foi armazenado em ambiente livre de úmida e luz até o momento da realização da análise de atividade anticancerígena dos extratos.

4.10 ANÁLISES DO EFEITO ANTITUMORAL NA LINHAGEM DE MELANOMA CUTÂNEO A375

4.10.1 Cultivo celular e tratamento

A linhagem celular A375 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Brasil. O método de cultivo foi de acordo com Pelinson et al. (2019). A linhagem celular foi cultivada em frascos com meio de cultivo Dulbecco (DMEM) contendo antibiótico e antifúngico (penicilina/estreptomicina), suplementado a 10% de soro bovino fetal. Foi utilizado DMEM com alto teor de glicose e L-glutamina. As células foram mantidas em incubadora umidificada a 37 °C e 5% de dióxido de carbono (CO₂) por 24 horas. Após o cultivo celular, as células foram tratadas com concentrações de 0,05, 0,1, 0,2 e 0,4 mg/mL de extrato de resíduo hidrodestilado.

4.10.2 Análise da viabilidade celular (MTT)

O ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) foi conduzido conforme descrito por Mosmann (1983) e Glowacz et al. (2022). Células de melanoma foram semeadas em placas de 96 poços, em quadruplicata, na densidade de $3,0 \times 10^4$ células/poço, e submetidas ao tratamento com o extrato obtido do resíduo liofilizado.

Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas uma vez com solução salina tamponada com fosfato (PBS; 0,1 M; pH 7,4), a fim de evitar interferências do composto testado. Em seguida, adicionou-se o reagente MTT (5 mg/mL; Sigma-Aldrich) previamente solubilizado em PBS, e as placas foram incubadas por 2 h a 37 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço para solubilização dos cristais de formazan formados pela redução do MTT por células metabolicamente ativas. A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm em leitor de microplacas multimodo SpectraMax i3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao grupo controle.

4.10.3 Ensaio de microscopia de fluorescência para viabilidade celular por coloração 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e potencial transmembranar das mitocôndrias por coloração com éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE)

Além do ensaio MTT, também foi utilizado microscopia de fluorescência para avaliar a viabilidade das células tumorais. Para este propósito, aproximadamente 1×10^5 células/poço foram semeadas em placas de 96 poços e lavadas duas vezes com PBS. Para o ensaio de viabilidade celular, as células foram coradas com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para verificar alterações morfológicas conforme descrito por McGahon et al (1995) e Hao et al. (2019). O composto DAPI é absorvido por células viáveis e cora ácidos nucleicos de cadeia dupla (ds) e de cadeia simples (ss). Quando o composto DAPI se difunde nas células, emite fluorescência azul após excitação em 358 nm em células viáveis.

Para avaliar o potencial transmembranar das mitocôndrias foi realizado a coloração com éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE). As células receberam a mesma abordagem de preparação que a coloração DAPI e foram incubadas por 30 min com 100 μ l de uma solução contendo TMRE (20 nM). As fotografias de fluorescência vermelhas foram tiradas sob excitação a 550 nm de acordo com Joshi e Bakowska (2011). Para todos os ensaios, as leituras foram realizadas em um microscópio de fluorescência com ampliação de 10 \times , e o brilho e o contraste foram ajustados linearmente pelo software ImageJ®. Os resultados foram expressos como porcentagem (%) da intensidade de fluorescência em relação ao controle.

4.10.4 Ensaio de migração celular

Para verificar a migração celular neoplásica, foi realizado o protocolo experimental proposto por Justus et al. (2014) e Suwei et al. (2022). Assim, foi semeado 1×10^6 células/poço em monocamada em placas de 6 poços. Após atingir a confluência, foi feita uma ferida com ponta estéril e fotografada com microscopia óptica (aumento de 4x). Em seguida, as células foram expostas ao tratamento com o extrato liofilizado. As análises foram realizadas no período após 24 horas. As células foram lavadas com soro fisiológico e procedemos à aquisição das imagens. Foram medidos cinco pontos diferentes na ferida utilizando o software ImageJ para realizar as análises estatísticas.

4.10.5 Perfil redox (ROS, NO_x, PSH e NPSH)

O perfil redox foi avaliado pelos níveis do marcador pró-oxidante de espécies reativas de oxigênio (ROS), níveis de óxido nítrico (NO_x) e pelos marcadores antioxidantes: tióis totais (PSH) e tióis não proteicos (NPSH). Para detectar espécies reativas de oxigênio (ROS), foi utilizado um kit comercial de detecção fluorimétrica de ROS (Sigma® Life Science, Darmstadt, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante. O produto da reação fluorimétrica, proporcional à quantidade de ROS presente após 24 horas de tratamento, foi medido com excitação a 490 nm e emissão a 520 nm (Thermo Scientific™ Variokan™ LUX). Os resultados são expressos como porcentagem de ROS (%) em relação ao controle.

A quantificação de óxidos de nitrogênio (NO_x) foi realizada por meio da determinação de nitrato/nitrito, conforme metodologia descrita por Tatsch et al. (2011), com modificações. O reagente de Griess foi preparado contendo 2% (m/v) de sulfanilamida e 0,2% (m/v) de N-(1-naftil)etilenodiamina di-hidroclorato (NED) em solução de ácido ortofosfórico a 5%. Alíquotas de 50 µL das amostras foram incubadas com 50 µL de cloreto de vanádio (VCl₃) a 0,08% (m/v), como agente redutor de nitrato a nitrito, e 50 µL do reagente de Griess, a 37 °C por 20 min.

O nitrito presente reage inicialmente com a sulfanilamida, formando um sal de diazônio, que subsequentemente se acopla ao NED, originando um composto azo de coloração púrpura. A absorbância foi mensurada a 540 nm, e a concentração de NO_x foi determinada por meio de curva padrão, com resultados expressos em µM.

Os níveis de tióis foram determinados segundo o método descrito por George L. Ellman et al. (1959), com adaptações, baseado na redução do ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), monitorada a 412 nm. Para quantificação de tióis totais (PSH), 40 µL do sobrenadante foram adicionados a 200 µL de tampão fosfato de potássio (1 M; pH 6,8) e 20 µL de DTNB em placa de 96 poços, procedendo-se à leitura imediata.

Para a determinação de tióis não proteicos (NPSH), as amostras foram previamente desproteinizadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10% (m/v), seguindo-se o mesmo procedimento analítico. A quantificação foi realizada por curva padrão de cisteína, e os resultados foram expressos em µM.

4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O efeito das variáveis independentes sobre o conteúdo fenólico total (CFT) e atividade antioxidante total (AAT) foram avaliados utilizando gráficos de Pareto e metodologia de

superfície de resposta. A análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ($\alpha = 5\%$), foi utilizada para comparar as médias. As análises estatísticas descritas foram realizadas utilizando o software STATISTICA (versão 5.0, 228 StatSoft Inc., Estados Unidos).

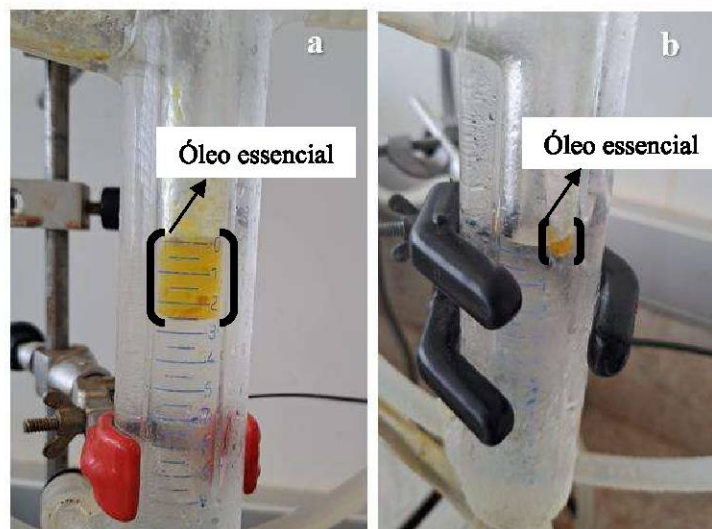
Os testes estatísticos de viabilidade celular e perfil redox foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 9. As amostras foram testadas utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. A significância estatística foi definida para valores de p de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5 RESULTADOS

5.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA DE ALECRIM PARA UTILIZAÇÃO NA EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO

Para a seleção da amostra de alecrim utilizada na extração por hidrodestilação, foram realizados ensaios preliminares de hidrodestilação para avaliar o rendimento de óleo essencial (mL/g de biomassa seca) obtido a partir de duas amostras de alecrim: Amostra 1 (amostra fresca, coletada em Chapecó-SC) e Amostra 2 (amostra adquirida em estabelecimento comercial). Ambas foram submetidas a 4 horas de extração contínua em destilador tipo Clevenger, utilizando 100 g de biomassa seca por ensaio. A Amostra 1 apresentou rendimento superior em relação à Amostra 2 ao longo do período de extração, conforme apresentado na Figura 19. Dessa forma, a Amostra 1 foi selecionada para os ensaios subseqüente.

FIGURA 19 – RENDIMENTOS DOS ENSAIOS PRELIMINARES EM CLEVINGER



a - Amostra 1 (amostra fresca, coletada em Chapecó-SC). b - Amostra 2 (amostra adquirida em estabelecimento comercial).

FONTE: A autora (2026).

5.2 OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO NA EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO

Após a seleção da Amostra 1, foram avaliados o rendimento do óleo essencial e a composição do perfil volátil em função do tempo de extração. Observou-se que, nos primeiros

30 minutos, ocorreu a maior taxa de extração, com rendimento aproximado de 2 mL de óleo essencial por 100 g de biomassa seca, indicando que a maior parte dos compostos voláteis foi liberada nas fases iniciais do processo. O rendimento obtido por hidrodestilação neste estudo (cerca de 2%) está em consonância com valores reportados na literatura para o mesmo método e amostra, como nos trabalhos de Boufetacha et al. (2024), com rendimento de 1,89%, Ferreira et al. (2020), com 2,35%, e Hudaib et al. (2022), com 2,56%.

Para a extração de óleo essencial de alecrim com outros métodos, diferentes autores reportam variações significativas no rendimento, em função da técnica empregada e das condições operacionais. Ferreira et al. (2020) ao aplicarem a extração simultânea sem solvente por hidrodifusão assistida por micro-ondas e gravidade, observaram rendimento de 2,32%. Por sua vez, Bousbia et al. (2009) ao utilizarem o mesmo método, obtiveram rendimento de 0,33%. No estudo conduzido por Spadi et al. (2021) utilizando destilação a vapor, foi obtido rendimento de 0,72% enquanto Conde-Hernández et al. (2017) obtiveram rendimentos de 2,35% para a destilação a vapor e 2,53% de óleo essencial de alecrim utilizando extração supercrítica com CO₂. Para o estudo de Sakar et al. (2023) os autores reportam rendimentos de até 2,85% empregando extração por micro-ondas sem solvente, por outro lado, para o estudo de Filly et al. (2014) empregando extração por micro-ondas sem solvente em escala laboratorial e piloto, os autores reportaram rendimentos de 0,54% e 0,50%, respectivamente.

Para verificar possíveis diferenças significativas na composição do perfil volátil ao longo do tempo de hidrodestilação, foram realizadas análises preliminares após 30 minutos e 4 horas de extração, conforme apresentado na Tabela 4.

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO PRELIMINAR DO PERFIL VOLÁTIL DO ALECRIM SUBMETIDO A 30 MINUTOS E 4 HORAS DE EXTRAÇÃO EM HIDRODESTILADOR

Composto	Nome Comum*	Teor (%) (30 min)	Teor (%) (240 min)
alpha-Pinene	α -Pino	15,04	8,32
beta-Myrcene	Mirceno	14,16	15,97
Eucalyptol	1,8-Cineol	8,28	8,75
Bicyclo[3,1,1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)-	β -Pino	5,25	5,05
Bicyclo[3,1,1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-	Verbenona	6,06	6,06
3-Cyclohexene-1-methanol, ,alpha,,alpha,4-trimethyl-	α -Propionato de terpinila	5,06	5,83

Tabela 4. (Continuação)			
Camphene	Canfeno	4,91	5,21
Bicyclo[2,2,1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)-	Cânfora	5,08	4,17
Isoborneol	Isoborneol	4,87	4,85
2,2-Bis(4'-methoxyphenyl)-2-ethoxyethane	Metoxicloro 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-metoxifenil)etano	3,26	nd
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	Linalol	3,21	3,89
1-Octen-3-ol	1-Octen-3-ol	3,05	nd
1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	γ -Terpineno	2,84	3,71
3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, (R)-	(-)-4-Terpineol	2,62	2,92
Bicyclo[4,1,0]hept-2-ene, 3,7,7-trimethyl-	2-Carene	nd	1,93
(+)-4-Carene	4-Careno	1,46	nd
Cyclohexene, 1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene-4-hexenyl)	β -Bisaboleno	0,34	1,52
Caryophyllene	Cariofileno	1,69	2,59
1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	α -Terpineno	1,61	2,12
1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z-	cis,cis,cis-1,1,4,8-Tetrametil-4,7,10-cicloundecatrieno	1,49	2,28
Naphthalene	Naftaleno	1,26	2,49
Bicyclo[3,1,1]hept-2-ene-2-methanol, 6,6-dimethyl-	Mirtenol	1,35	1,44
alpha-Phellandrene	α -Felandreno	1,30	1,71
Bicyclo[3,1,0]hex-2-ene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-	β -Tujeno	0,82	1,52
2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl-6-(1-methylethenyl)-	Isopiperitona	1,13	0,61
Bicyclo[3.1.1]heptan-3-one, 2,6,6-trimethyl-, (1.alpha.,2.alpha.,5.alpha.)-	(E)-Pinanona	0,71	nd
Bornyl acetate	Acetato de bornila	0,55	1,37
Copaene	Copaeno	nd	0,40
1,6-Heptadien-4-ol, 4-propyl-	1,6-Heptadien-4-ol, 4-propil-	0,36	1,30
l-(+)-Ascorbic acid 2,6-dihexadecanoate	Ácido L-ascórbico	nd	0,35
alpha-Bisabolol	(-)- α -Bisabolol	0,27	0,86
Caryophyllene oxide	Óxido de cariofileno	0,25	0,24
Pulegone	Pulegona	0,20	nd

Tabela 4. (Conclusão)

1-Dodecanol	1-Dodecanol	0,26	nd
Phytol	Fitol	0,18	0,59
1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)-	α -Nerolidol	0,06	0,20
Retinol	Retinol	0,05	0,09
Total (%)		99,03	98,34
Outros Compostos (<0,05 %)		0,77	1,66

*National Institute of Standards and Technology U.S Department of Commerce

FONTE: A autora (2026)

Considerando os principais constituintes identificados nos óleos essenciais de alecrim — α -pineno, mirceno, 1,8-cineol, β -pineno, verbenona, canfeno, cânfora, isoborneol e linalol (Aziz et al., 2022; Ali, Chua e Chow, 2019) — observa-se que a variação na concentração relativa desses compostos entre os tempos de extração de 30 minutos e 4 horas foi inferior a 1% para a maioria dos componentes. Exceções foram observadas para o mirceno, cuja concentração relativa (área de pico) aumentou em 1,81%, e para o α -pineno, que apresentou uma redução relativa (área de pico) de 6,72%.

O α -pineno pertence ao sistema bicyclo [3,1,1] hept-2-ene e é intermediário chave na síntese orgânica de vários outros compostos devido a sua reatividade relativamente alta, como γ -terpineno, α -terpineno, cânfora, verbenona, acetato de bornila entre outros (Hanssens et al., 2025). Ainda o α -pineno possui atividades antiapoptóticas, antioxidantes e um forte efeito inibitório sobre a inflamação em condições patológicas, protegendo o sistema nervoso contra inflamações e danos oxidativos. Devido a sua importância farmacológica, enfatizando sua atividade anti-inflamatória e os mecanismos de ação, atribui-se grande importância a presença desse composto no óleo essencial (Khoshnazar et al., 2020; Akhtazad et al., 2024).

Considerando o volume total de óleo essencial extraído, a eficiência energética associada ao tempo de hidrodestilação e o perfil volátil obtido, a condição de 30 minutos de hidrodestilação da Amostra 1 foi selecionada para os experimentos subsequentes, realizados em triplicata.

5.3 COMPOSIÇÃO DO PERFIL VOLÁTIL DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM

A Tabela 5 apresenta a composição definitiva do perfil volátil do óleo essencial extraído da amostra fresca de alecrim por meio do processo de hidrodestilação durante 30 minutos. O processo de hidrodestilação foi realizado em triplicata. A caracterização do óleo essencial de

alecrim através do método de GC-MS revelou a presença de 48 compostos, destacando-se os seguintes majoritários: α -pineno (16,45%), mirceno (13,23%), 1,8-cineol (8,28%), β -pineno (5,39%), verbenona (5,23%), α -propionato de terpinila (5,38%), canfeno (5,19%), cânfora (4,67%), isoborneol (4,98%) e linalol (3,54%).

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DEFINITIVA DO PERFIL VOLÁTIL DO ALECRIM SUBMETIDO A 30 MINUTOS DE EXTRAÇÃO EM HIDRODESTILADOR

Composto	Nome Comum*	Teor (%)**
alpha-Pinene	α -Pineno	16,45 \pm 1,99
beta-Myrcene	Mirceno	13,23 \pm 1,30
Eucalyptol	1,8-Cineol	8,28 \pm 1,27
Bicyclo[3,1,1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)-	β -Pineno	5,39 \pm 0,82
3-Cyclohexene-1-methanol, ,alpha,,alpha,4-trimethyl-	α -Propionato de terpinila	5,38 \pm 0,74
Bicyclo[3,1,1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-	Verbenona	5,23 \pm 0,73
Camphene	Canfeno	5,19 \pm 0,79
Isoborneol	Isoborneol	4,98 \pm 0,77
Bicyclo[2,2,1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)-	Cânfora	4,67 \pm 0,58
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	Linalol	3,54 \pm 0,62
1-Octen-3-ol	1-Octen-3-ol	3,10 \pm 0,07
2,2-Bis(4'-methoxyphenyl)-2-ethoxyethane	Metoxicloro 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-metoxifenil)etano	3,06 \pm 0,97
1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	γ -Terpineno	2,94 \pm 0,49
3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, (R)-	(-)-4-Terpineol	2,76 \pm 0,42
Caryophyllene	Cariofileno	1,85 \pm 0,28
(+)-4-Carene	4-Careno	1,70 \pm 0,29
1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	α -Terpineno	1,60 \pm 0,26
1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z-	cis,cis,cis-1,1,4,8-Tetrametil-4,7,10-cicloundecatrieno	1,59 \pm 0,24
Naphthalene	Naftaleno	1,46 \pm 0,31
Bicyclo[3,1,1]hept-2-ene-2-methanol, 6,6-dimethyl-	Mirtenol	1,46 \pm 0,21
alpha-Phellandrene	α -Felandreno	1,39 \pm 0,22
Bicyclo[3,1,0]hex-2-ene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-	β -Tujeno	0,81 \pm 0,16
2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl-6-(1-methylethenyl)-	Isopiperitona	0,79 \pm 0,34
Bicyclo[3,1,1]heptan-3-one, 2,6,6-trimethyl-, (1.alpha.,2.alpha.,5.alpha.)-	(E)-Pinanona	0,70 \pm 0,12
Bornyl acetate	Acetato de bornila	0,58 \pm 0,09
1,6-Heptadien-4-ol, 4-propyl-	1,6-Heptadien-4-ol, 4-propil-	0,39 \pm 0,03
Cyclohexene, 1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene-4-hexenyl)	β -Bisaboleno	0,29 \pm 0,05
alpha-Bisabolol	(-)- α -Bisabolol	0,28 \pm 0,02
Caryophyllene oxide	Óxido de cariofileno	0,22 \pm 0,03
Pulegone	Pulegona	0,22 \pm 0,04
1-Dodecanol	1-Dodecanol	0,19 \pm 0,09

Tabela 5. (Conclusão)		
Phytol	Fitol	0,11 ± 0,05
1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)-	α -Nerolidol	0,06 ± 0,00
Retinol	Retinol	0,05 ± 0,00
Total		99,94 ± 1,91
Outros Compostos (<0,05%)		0,20 ± 0,01

*National Institute of Standards and Technology U.S Department of Commerce

**Resultado de triplicatas \pm desvio padrão

FONTE: A autora (2026)

As concentrações relativas (áreas de pico) de α -pineno foram obtidas dentro da faixa esperada, enquanto a cânfora apresentou valores ligeiramente inferiores aos descritos na literatura. Os teores variaram entre 10,70% e 15,82% para α -pineno e entre 8,44% e 17,33% para cânfora (Boufetacha et al., 2024; Hudaib et al., 2022; Elyemni et al., 2019; Ferreira et al., 2020). De modo geral, os valores reportados por outros métodos de extração também se mantêm próximos dessas faixas. Por exemplo, Boufetacha et al. (2024) relataram concentrações de 10,70% para α -pineno e 6,90% para cânfora utilizando destilação a vapor, enquanto Ferreira et al. (2020) encontraram 12,51% e 17,51%, respectivamente, empregando hidrodifusão por micro-ondas e gravidade.

A principal discrepância observada refere-se ao 1,8-cineol, geralmente descrito como composto majoritário, independentemente do método de extração, com teores entre 25,50% e 50,30% (Hudaib et al., 2022; Ferreira et al., 2020; Boufetacha et al., 2024). No presente estudo, entretanto, esse composto foi quantificado em apenas 8,28%. Em contrapartida, o teor de mirceno (13,23%) foi significativamente superior aos valores usualmente reportados, que variam de 0,40% a 1,46% (Hudaib et al., 2022; Boufetacha et al., 2024) para métodos como hidrodestilação, destilação a vapor e hidrodifusão por micro-ondas.

Os compostos β -pineno (5,39%), canfeno (5,19%) e isoborneol (4,98%) apresentaram concentrações compatíveis com as faixas descritas na literatura. Para β -pineno, os valores variam de 3,56% (Elyemni et al., 2019) a 4,16% (Ferreira et al., 2020). O canfeno apresenta teores entre 3,80% e 9,77% (Ferreira et al., 2020; Boufetacha et al., 2024; Hudaib et al., 2022; Elyemni et al., 2019), enquanto o isoborneol foi reportado em 4,14% por Ferreira et al. (2020) e 5,33% por Boufetacha et al. (2024), todos utilizando hidrodestilação. Resultados semelhantes também são observados quando comparados a outros métodos de extração: para β -pineno, 6,99% (destilação a vapor) e 3,25% (hidrodifusão por micro-ondas), para canfeno, 4,86% (destilação a vapor) e 2,48% (hidrodifusão por micro-ondas) e para isoborneol, 5,12%

(destilação a vapor) e 5,01% (hidrodifusão por micro-ondas), conforme descrito por Ferreira et al. (2020) e Boufetacha et al. (2024), respectivamente.

O composto verbenona (5,23%) apresentou teor superior ao encontrado por Hudaib et al. (2022) de 1,2% e Elyemni et al. (2019) de 0,15%. O linalol (3,54%) também foi quantificado em concentração maior do que a reportada por Elyemni et al. (2019), de 1,49%.

5.4 CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para do conteúdo fenólico total (CFT) e a atividade antioxidante total (AAT) sob diferentes condições de extração, conforme o delineamento experimental proposto nesse estudo. A análise comparativa permite identificar quais combinações de variáveis favorecem a maior recuperação de compostos bioativos e atividade antioxidante total, contribuindo para a otimização do processo.

TABELA 6 - CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL (CFT) E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT) SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO, CONFORME O DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão sólido-líquido (mg/mL)	Concentração de etanol (%)	CFT* (mg AGE/ g biomassa seca)	AAT*	
					mg TE/ g de biomassa seca	µmol TE/g biomassa seca
1	30 (-1)	20 (-1)	20 (-1)	56,53 ± 2,11 ^{dc}	1,26 ± 0,23 ^b	5,04 ± 0,23 ^b
2	70 (+1)	20 (-1)	20 (-1)	46,56 ± 1,63 ^d	1,24 ± 0,26 ^b	4,95 ± 0,26 ^b
3	30 (-1)	60 (+1)	20 (-1)	52,53 ± 0,42 ^d	0,42 ± 0,15 ^c	1,68 ± 0,15 ^c
4	70 (+1)	60 (+1)	20 (-1)	67,92 ± 2,10 ^{cb}	0,43 ± 0,15 ^c	1,72 ± 0,15 ^c
5	30 (-1)	20 (-1)	60 (+1)	104,26 ± 2,24 ^a	2,57 ± 0,05 ^a	10,25 ± 0,05 ^a
6	70 (+1)	20 (-1)	60 (+1)	18,34 ± 1,42 ^e	2,23 ± 0,30 ^a	8,91 ± 0,30 ^a
7	30 (-1)	60 (+1)	60 (+1)	77,99 ± 2,11 ^b	0,85 ± 0,01 ^b	3,40 ± 0,01 ^b
8	70 (+1)	60 (+1)	60 (+1)	19,76 ± 1,70 ^e	0,72 ± 0,31 ^{bc}	2,88 ± 0,31 ^{bc}
9	50 (0)	40 (0)	40 (0)	28,83 ± 1,44 ^e	1,26 ± 0,02 ^b	5,03 ± 0,02 ^b

* Resultado de triplicatas ± desvio padrão

FONTE: A autora (2026)

As condições de extração assistida por ultrassom adotadas no ensaio 5 proporcionaram o maior teor de compostos fenólicos totais (CFT), atingindo 104,26 mg GAE/g de extrato. Esse resultado se destaca por representar um valor expressivo em relação aos reportados na literatura. Para alecrim fresco, Xie et al. (2023) reportaram concentrações variando entre 129,94 e 213,85 mg GAE/g sob diferentes condições de ultrassom, enquanto Santos et al. (2025), na melhor condição de extração assistida por ultrassom empregada, obteve 57,08 mg GAE/g. Em relação a resíduos de hidrodestilação, Irakli et al. (2023) alcançou 119,6 mg GAE/g utilizando extração

assistida por ultrassom e 145,3 mg GAE/g por extração acelerada com solvente. Outros estudos, como Psarrou et al. (2020) e Christaki et al. (2022), apresentaram valores inferiores, de 77,5 mg GAE/g com extração assistida por ultrassom e 86,25 mg GAE/g utilizando a extração simultânea de hidrodestilação assistida por micro-ondas, respectivamente. Assim, o resultado obtido neste estudo confirma que a aplicação da extração assistida por ultrassom ao resíduo pós-hidrodestilação é uma estratégia eficaz para agregar valor, podendo atingir níveis próximos aos reportados para alecrim fresco e reforçando a relevância da otimização das condições de extração.

Os valores de atividade antioxidante total (AAT) obtidos neste estudo foram inferiores aos relatados em outras pesquisas envolvendo tanto extrações de amostras frescas como resíduos hidrodestilados de alecrim. O estudo Irakli et al. (2023) alcançou 185 mg TE/g empregando extração assistida por ultrassom em resíduo hidrodestilado enquanto o estudo de Christaki et al. (2022) reporta 47,87 mg TE/g de extrato utilizando extração simultânea por hidrodestilação assistida por micro-ondas. Contudo, Santos et al. (2025) encontrou apenas 2,15 mg TE/g para alecrim fresco submetido à extração assistida por ultrassom, utilizando amostras colhidas na mesma região e sob as mesmas condições experimentais aplicadas neste estudo.

Essa discrepância reforça que, apesar do uso mundial da DPPH, diferentes adaptações metodológicas, incluindo diferentes concentrações iniciais do DPPH, diferentes alíquotas dos extratos e do DPPH e diferentes tempos de reação — Irakli et al. (2023): 150 μ L do extrato diluído, 2,85 mL de solução DPPH (0,1 mM em metanol), absorção medida em 516 nm após 5 minutos de reação. Christaki et al. (2022): 100 μ L de extrato fenólico, 2,85 mL de DPPH (0,1 mM em metanol), absorção medida em 516 nm após 5 minutos de reação. Santos et al. (2025) e esse estudo: 40 μ L do extrato, 160 μ L de solução DPPH (0,1 mM em metanol), absorção medida em 517 nm após 30 minutos de reação — dificultam a comparação da atividade antioxidante total (Scherer e Godoy, 2009; Sacramento et al., 2023).

Além disso Brand-Williams et al. (1995) descrevem três padrões cinéticos distintos na reação entre compostos antioxidantes e o radical DPPH: reação rápida, na qual o estado estacionário é alcançado em menos de um minuto, reação intermediária, com estabilização em aproximadamente 30 minutos e reação lenta, caracterizada por um equilíbrio atingido entre 1 e 6 horas. Essa cinética também dificulta a quantificação e comparação da atividade antioxidante total pelo método de DPPH. Ainda assim, conforme demonstrado por Santos et al. (2025), mesmo o extrato quantificado com baixa atividade antioxidante apresentou efeitos antiproliferativos relevantes contra células de melanoma.

5.4.1 Análise estatística conteúdo fenólico total e atividade antioxidante total

Com o objetivo de avaliar as influências das variáveis estudadas sobre as respostas de interesse e validar os modelos propostos, foram realizadas análises de variância (ANOVA) para o Conteúdo Fenólico Total (CFT) e para a Atividade Antioxidante Total (AAT). As validações dos modelos estão apresentadas na Tabela 7 e na Tabela 8.

TABELA 7 - ANOVA CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL (CFT)

Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Média dos quadrados	Teste F
Regressão	17.355,42	6	2.892,57	26,43
Residual	2.188,19	20	109,41	
Total	19.543,61	26		
F tabelado ($p \leq 0,05$)		2,60		
R ²		88,80		

FONTE: A autora (2026)

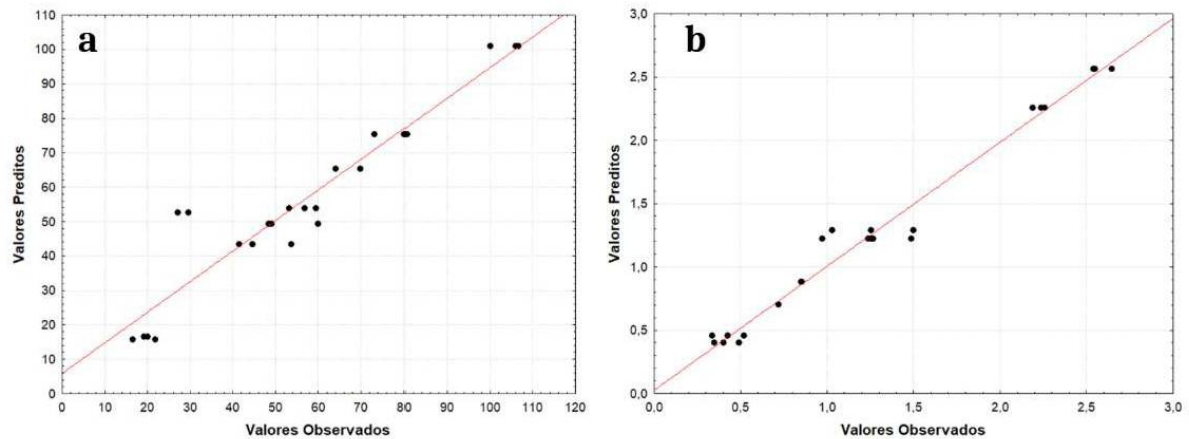
TABELA 8 - ANOVA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT)

Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Média dos quadrados	Teste F
Regressão	13,58	6	2,26	150,67
Residual	0,29	20	0,0015	
Total	13,87	26		
F tabelado ($p \leq 0,05$)		2,60		
R ²		97,86		

FONTE: A autora (2026)

O Figura 20 apresenta a relação entre os valores preditos pelo modelo e os valores observados para CFT e AAT para confirmar a adequação do modelo e sua capacidade de representar os dados experimentais.

FIGURA 20 – VALORES PREDITOS E VALORES OBSERVADOS PARA CFT E AAT



a – Conteúdo fenólico total (CFT). **b** – Atividade antioxidante total (AAT).

FONTE: A autora (2026)

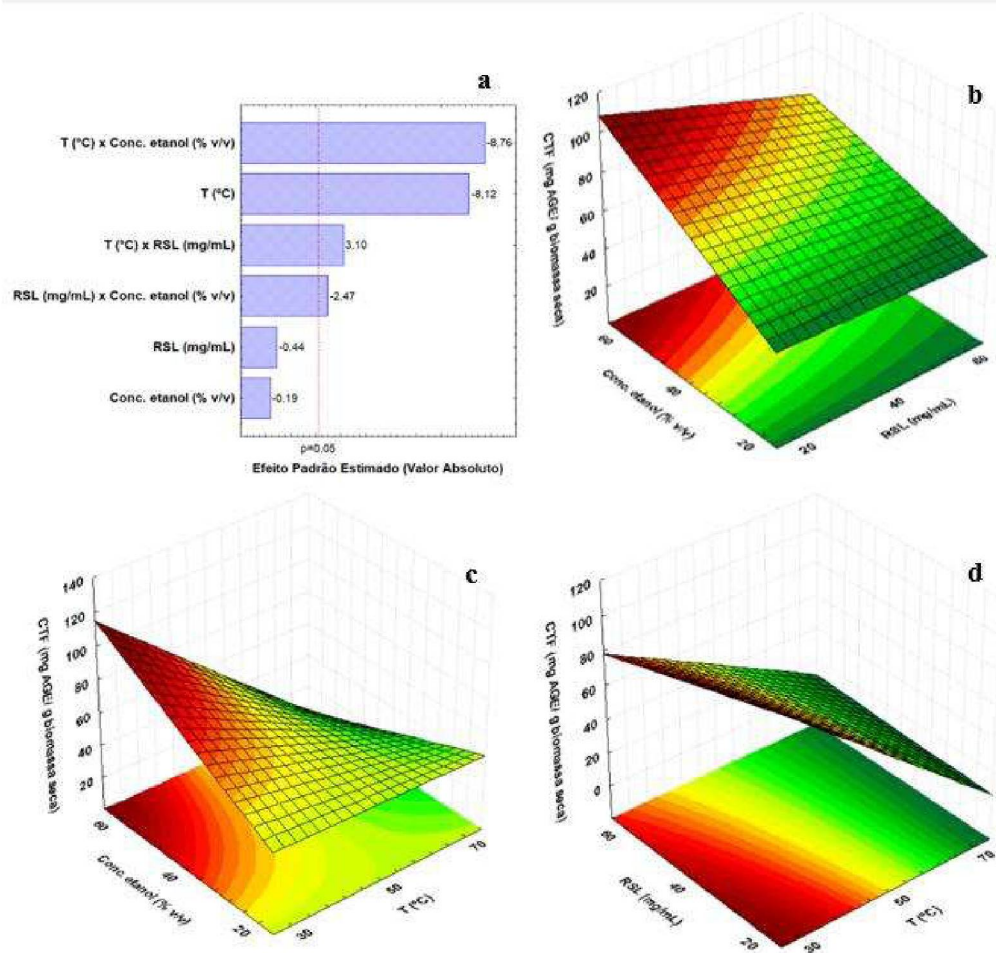
Os resultados da ANOVA apresentados na Tabela 7 e na Tabela 8 revelam que os modelos são significativos para CTF e AAT ($p \leq 0,05$). Os valores F tabelados em comparação aos valores do Teste F implicam que o modelo pode prever a variação com precisão. O R^2 de 0,8880 para o modelo de CTF e o R^2 de 0,9786 para o modelo de AAT indicam que 88,80% e 97,86% das variações totais de CTF e AAT, respectivamente, são atribuídas às variáveis independentes. Ainda, é possível visualizar no Gráfico 2 um alto grau de correlação entre os valores experimentais e previstos para CTF e AAT.

A Figura 21 apresenta duas análises utilizadas para avaliar a influência das variáveis independentes sobre o conteúdo fenólico total. O gráfico de Pareto, que permite identificar a magnitude e a significância estatística dos efeitos principais e das interações entre as variáveis, destacando quais fatores exercem maior impacto no processo e as superfícies de respostas, que ilustram graficamente as relações entre as variáveis independentes e o conteúdo fenólico total, possibilitando uma visualização das regiões ótimas para maximização do conteúdo fenólico total. Essa abordagem combinada é essencial para compreender a dinâmica do planejamento experimental e obter a melhor condição do planejamento

A avaliação dos efeitos padronizados, apresentada no gráfico de Pareto, Figura 19a, indica que os fatores e interações possuem diferentes níveis de influência sobre a concentração final de CTF. Observa-se que os efeitos mais expressivos e significativos ($p \leq 0,05$) são a interação entre temperatura e concentração de etanol, seguida pelo efeito individual da temperatura e pela interação entre temperatura e razão sólido-líquido. Por outro lado, os efeitos individuais das variáveis razão sólido-líquido e concentração de etanol não foram

significativos, isso indica que, isoladamente, esses fatores não exercem influência relevante sobre a concentração de CFT.

FIGURA 21 - EFEITO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES NO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL (CFT)



a. Gráfico de Pareto. b. Superfície resposta para concentração de etanol (% v/v) e razão sólido-líquido RSL (mg/mL) (com temperatura fixada na variável -1). c. Superfície resposta para concentração de etanol (% v/v) e Temperatura T (°C) (com razão sólido-líquido fixada na variável 0). d. Superfície resposta para razão sólido-líquido RSL (mg/mL) e Temperatura T (°C) (com concentração de etanol fixada na variável 0).

FONTE: A autora (2026)

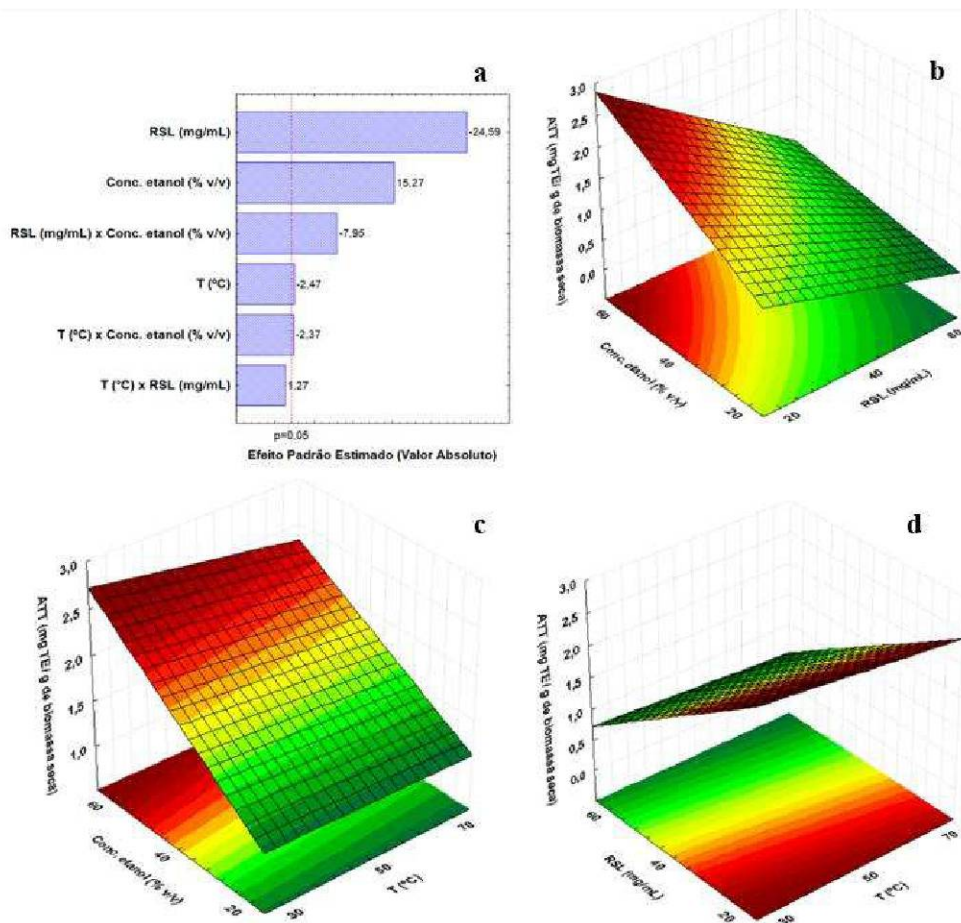
A interação temperatura e concentração de etanol apresentou o maior efeito absoluto (-8,76), evidenciando que a concentração de CFT é fortemente dependente da combinação desses dois fatores. O sinal negativo indica que o aumento simultâneo da temperatura e da concentração de etanol tende a reduzir a variável resposta e como o efeito individual da temperatura é negativa (-8,12), podemos constatar que a melhor resposta sobre o efeito da interação temperatura e concentração de etanol ocorre em temperaturas mais baixas e concentrações de etanol mais elevadas.

A interação entre temperatura e razão sólido-líquido também foi significativa, com efeito positivo (+3,10) contudo, como ambos os fatores apresentam efeito negativo individualmente, a interação positiva indica que a diminuição conjunta desses fatores promove incremento na resposta. A interação entre razão sólido-líquido e etanol (-2,47) apresentou efeito moderado e negativo, sugerindo que em níveis elevados simultâneos essa interação reduz a concentração de CFT.

Em síntese, os resultados demonstram que para a obtenção de CFT, a temperatura é o fator mais crítico, tanto isoladamente quanto em interação com outros parâmetros, especialmente com a concentração de etanol.

A Figura 22 apresenta duas análises utilizadas para avaliar a influência das variáveis independentes sobre a atividade antioxidante total.

FIGURA 22 - EFEITO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES NA ATIVIDADE ATIOXIDANTE TOTAL (AAT)



a. Gráfico de Pareto. b. Superfície resposta para concentração de etanol (% v/v) e razão sólido-líquido RSL (mg/mL) (com temperatura fixada na variável -1). c. Superfície resposta para concentração de etanol (% v/v) e Temperatura T (°C) (com razão sólido-líquido fixada na variável 0). d. Superfície resposta para razão sólido-líquido RSL (mg/mL) e Temperatura T (°C) (com concentração de etanol fixada na variável +1).

FONTE: A autora (2026)

O gráfico de Pareto evidencia a intensidade e a relevância estatística dos efeitos principais e das interações entre os fatores, apontando aqueles que mais impactam na obtenção de altas concentrações de atividade antioxidante total, e as superfícies de resposta, que representam de forma visual como as variáveis independentes se relacionam com a atividade antioxidante total, permitindo identificar as regiões mais favoráveis para sua maximização. Essa combinação de análises é fundamental para compreender o comportamento do sistema e definir as melhores condições dentro do planejamento experimental.

Os fatores que influenciam a concentração de AAT são apresentadas pela análise dos efeitos padronizados, no gráfico de Pareto Figura 20a, evidenciando que os fatores possuem diferentes magnitudes e direções de influência sobre a variável resposta. Observa-se que os efeitos mais expressivos e significativos ($p \leq 0,05$) são a razão sólido-líquido, a concentração de etanol e a interação entre essas duas variáveis.

O fator razão sólido-líquido apresentou o maior efeito absoluto (-24,59). O sinal negativo indica que o aumento da razão sólido-líquido reduz expressivamente a resposta, sugerindo que níveis baixos desse fator são essenciais para otimização do processo. Em seguida, destaca-se a concentração de etanol, com efeito positivo (+15,27), indicando que o aumento desse fator tende a aumentar a resposta.

A interação entre razão sólido-líquido e concentração de etanol (-7,95) apresentou efeito moderado e negativo, reforçando o efeito oposto entre as duas variáveis, quando ambos os fatores estão em níveis elevados, a resposta é menor, devido ao efeito negativo da razão sólido-líquido. Essa interação reforça a necessidade de ajustes combinados, evitando cenários em que razão sólido-líquido e etanol estejam simultaneamente altos.

Por outro lado, os efeitos principais da temperatura (-2,47) e as interações temperatura e etanol (-2,37) e temperatura e razão sólido-líquido (+1,27) não foram significativos. Isso indica que, diferente da resposta para CFT, a temperatura, isoladamente ou em interação com outros fatores, não exerce influência relevante sobre a concentração de AAT. Em síntese, os resultados demonstram que a concentração de razão sólido-líquido é o fator mais crítico, seguida pela concentração de etanol e pela interação entre ambos.

Para a variável CTF, os efeitos mais relevantes foram associados à temperatura e à sua interação com a concentração de etanol, indicando que níveis mais baixos de temperatura e concentrações mais elevadas de etanol tendem a maximizar a resposta. Em contraste, para a variável AAT, os efeitos negativos predominantes da razão sólido-líquido e de sua interação com a concentração de etanol, aliados ao efeito positivo do etanol, sugerem que a otimização deve priorizar a redução de razão sólido-líquido e o aumento da concentração de etanol. A

ausência de significância da temperatura neste modelo indica que esse parâmetro não exerce impacto expressivo sobre a resposta.

Contudo, tanto para a resposta de CFT quanto para a resposta de ATT, os gráficos de superfície respostas evidenciam que a otimização não foi alcançada. De acordo com Myers, Montgomery e Anderson-Cook (2009), a caracterização de um ponto ótimo em modelos de segunda ordem depende da presença de curvatura significativa associada aos termos quadráticos. No presente estudo, a superfície de resposta não apresentou comportamento côncavo característico de máximo local, não sendo observados contornos elípticos concêntricos. Dessa forma, o ponto estacionário estimado não pode ser classificado como ponto de máximo. Assim, não foi atingida condição de otimização dentro da região experimental avaliada, podendo o ponto ótimo situar-se fora dos limites estudados.

5.5 COMPOSIÇÃO DO PERFIL NÃO VOLÁTIL DO EXTRATO DE ALECRIM

A Tabela 9 apresenta a quantificação dos compostos não voláteis presentes no resíduo obtido sob as condições definidas pelo planejamento experimental com extração assistida por ultrassom, do resíduo hidrodestilado de alecrim.

TABELA 9 - COMPOSIÇÃO DO PERFIL NÃO VOLÁTIL DO RESÍDUO HIDRODESTILADO DO ALECRIM SUBMETIDO AO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ASSISTIDO POR ULTRASSOM

Ensaio	Vanilina* (µg/g)	Ácido Cafeico* (µg/g)	Ácido p-Cumárico* (µg/g)	Ácido Gálico* (µg/g)	Ácido Rosmarínico* (µg/g)
1	99,77 ± 2,41	56,21 ± 0,35	18,06 ± 0,04	10,38 ± 0,32	38,86 ± 1,28
2	74,18 ± 3,14	38,96 ± 2,55	3,45 ± 1,95	1,46 ± 0,52	14,90 ± 1,27
3	38,98 ± 0,56	23,26 ± 4,45	15,40 ± 1,25	2,85 ± 0,46	16,22 ± 0,42
4	50,22 ± 3,73	26,30 ± 5,67	15,23 ± 1,23	1,85 ± 0,82	10,40 ± 2,56
5	114,82 ± 0,58	37,60 ± 0,37	0,98 ± 0,28	n.d.	10,87 ± 0,24
6	78,63 ± 1,22	21,78 ± 0,71	n.d.	2,66 ± 0,50	8,51 ± 0,61
7	23,50 ± 1,92	5,87 ± 1,72	0,39 ± 0,66	0,15 ± 0,06	3,97 ± 0,78
8	38,86 ± 1,70	13,33 ± 0,66	1,67 ± 0,66	0,58 ± 0,17	4,83 ± 0,10
9	75,96 ± 3,51	12,10 ± 0,46	n.d.	1,04 ± 0,29	8,46 ± 0,33

*Resultado em de triplicatas ± desvio padrão. n.d.: O composto não está presente ou está presente em concentrações abaixo do limite de detecção. 4-Hidroxibenzidrazida, Flavona, Miricetina, Catequina, Rutina, Kaempferol, Ácido sinápico, Pirocatecol, Ácido síringico e Ácido ferúlico não detectados em nenhum ensaio.

FONTE: A autora (2026)

Os valores de ácido rosmarínico reportados na literatura para extração assistida por ultrassom podem ser elevados tanto em resíduos de alecrim hidrodestilados (16,60 mg/g, Psarrou et al., 2020; 53,91 mg/g, Irakli et al., 2023) quanto em alecrim fresco (15,94 mg/g, Sharma et al., 2020; 54,14 mg/g, Dhouibi et al., 2023). Entretanto, os resultados do presente estudo indicam que grande parte do ácido rosmarínico foi removido durante a hidrodestilação, corroborando as observações de Santana-Méridas et al. (2014), que não detectou esse composto no resíduo sólido após extração assistida por ultrassom. Essa evidência é reforçada pelo trabalho de De Elguea-Culebras et al. (2023), que encontrou 27,47 mg/g de ácido rosmarínico na água residuária da hidrodestilação de alecrim. Considerando que o ácido rosmarínico é altamente polar e apresenta elevada solubilidade em água (Psarrou et al., 2020; Ziane et al., 2022), assim, a extração prévia por hidrodestilador removeu grande parte desse composto.

O composto ácido cafeico apresenta ampla variação de concentrações reportadas na literatura quando se avalia sua presença após tratamentos com ultrassom, tanto em resíduos hidrodestilados quanto em alecrim fresco. No presente estudo, os valores obtidos para ácido cafeico foram semelhantes aos relatados por Sharma et al. (2020), que empregaram extração assistida por ultrassom utilizando os solventes puros de água e metanol em alecrim fresco, obtendo concentrações de 2,40 µg/g e 23,77 µg/g, respectivamente.

Por outro lado, Irakli et al. (2021) quantificaram 374,0 µg/g de ácido cafeico em resíduo proveniente da extração de óleo essencial de alecrim, seguidos de extração por ultrassom com metanol 70%, enquanto Christaki et al. (2022), também utilizando ultrassom com metanol 70% em resíduo hidrodestilado de alecrim, encontraram concentrações de 120,0 µg/g. Skendi, Irakli e Chatzopoulou (2017) reportaram valores de 131,0 µg/g para extração em metanol 70% e 5,7 µg/g para extração em água, ambos aplicados a alecrim fresco submetidos a extração em ultrassom.

No presente estudo, as maiores concentrações de ácido gálico e ácido p-cumárico, 10,38 µg/g e 18,06 µg/g respectivamente, ocorreram no ensaio 1 (120 min, 30°C, razão 1:20, etanol 20%). Na literatura em condições semelhante utilizando extração assistida por ultrassom, os autores Skendi et al. (2017) reportaram concentrações menores de ácido gálico, 2,1 µg/g (20 min, <30°C, razão 1:125, metanol 70%) e 1,2 µg/g (20 min, <30°C, razão 1:125, água), contudo observaram valores superiores para o ácido p-cumárico 71,5 µg/g (20 min, <30°C, razão 1:125, metanol 70%) e 38,4 µg/g (20 min, <30°C, razão 1:125, água) para alecrim fresco. Já Irakli et al. (2021) não detectaram ácido gálico e nem ácido p-cumárico em resíduos pós-extração de óleo essencial e após ultrassom (30 min, 30°C, razão 1:5, metanol 70%). Conforme observado

e conforme apontado por Bernatoniene et al. (2016) e Oreopoulou et al. (2021), solventes orgânicos, como metanol, etanol, acetona, com água são mais eficazes do que água pura para extração de ácidos fenólicos, diterpenos, flavonoides e compostos fenólicos que possuem polaridade intermediária.

A vanilina foi o composto detectado em maior concentração no extrato obtido. Entretanto, esse composto raramente é reportado na literatura, sendo mais comum a quantificação do ácido vanílico, devido à conversão da vanilina em ácido vanílico durante processos que envolvem aquecimento. Essa transformação é influenciada principalmente pela temperatura e pelo tempo de exposição térmica: quanto maior o tempo de tratamento, menor a quantidade de vanilina remanescente, enquanto o ácido vanílico é formado gradualmente. Tal conversão é considerada benéfica, pois o ácido vanílico apresenta maior atividade antioxidante em comparação à vanilina (Mourtzinou et al., 2009). Dessa forma, amostras submetidas a longos períodos de hidrodestilação tendem a apresentar predominância de ácido vanílico. No entanto, o processo utilizado neste estudo, com tempo reduzido de hidrodestilação (30 minutos, em contraste com o método tradicional de aproximadamente 4 horas), favoreceu a preservação da vanilina no extrato.

Brand-Williams et al. (1995) apontam que o ácido gálico, ácido rosmarínico e ácido cafeico apresentam alto poder antioxidante, enquanto compostos como ácido p-cumárico e vanilina apresentam baixa atividade antioxidante. Os mesmos autores relataram que a vanilina, assim como ácido p-cumárico, ácido cafeico e ácido gálico estão entre as substâncias que reagem lentamente com o DPPH reagente na quantificação da atividade antioxidante.

5.6 EFEITO ANTITUMORAL NA LINHAGEM DE MELANOMA CUTÂNEO A375

5.6.1 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

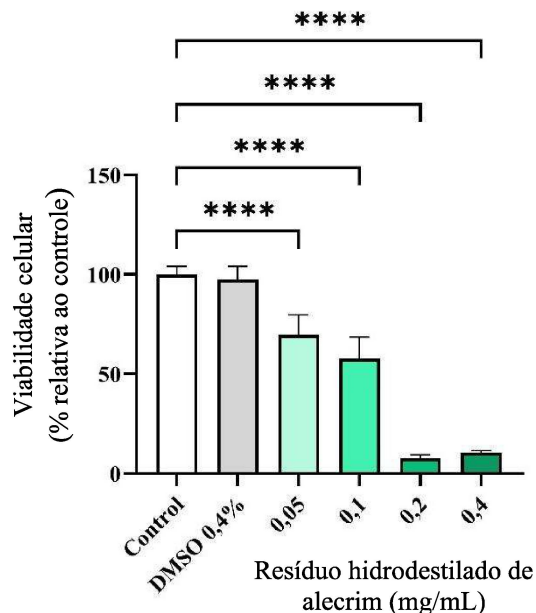
A Figura 23 mostra a viabilidade da linhagem celular A375 tratada por 24 horas com extrato do resíduo de alecrim. As concentrações de extrato em todas as condições testadas reduziram significativamente a viabilidade das células em comparação com o controle ($p < 0,0001$). O extrato, na concentração de 0,05 mg/mL, proporcionou cerca de 65% de viabilidade celular.

Os resultados obtidos neste estudo estão alinhados com a literatura, que também demonstra um efeito citotóxico significativo de compostos derivados de *R. officinalis* sobre células A375. Por exemplo, Cocan et al. (2017), após aplicar extratos etanólicos de *R. officinalis*

em linhagem celular de melanoma A375, obteve viabilidade de 56% na concentração de 0,050 mg/mL e 45,5% na concentração de 0,1 mg/mL após 72 horas.

No estudo de Huang et al. (2021), a atividade das células A375 diminuiu com o aumento da concentração de ácido rosmarínico. Em uma concentração de ácido rosmarínico de 0,2 mg/mL, a atividade celular caiu abaixo de 80% em 24 horas e para cerca de 50% para em 48 horas. Russo et al. (2009) avaliou o extrato de *R. Officinalis* contendo ácido carnósico, ácido rosmarínico e carnosol em células A375 com diferentes concentrações por 72 horas, na concentração de 0,040 mg/mL, a viabilidade celular foi de 42%, contudo, devido a concentração de ácido rosmarínico encontrada nesse estudo, os resultados obtidos de redução da viabilidade celular é provavelmente decorre de interações sinérgicas entre seus constituintes bioativos (Vanilina, Ácido Cafeico, Ácido p-Cumárico, Ácido Gálico e Ácido Rosmarínico).

FIGURA 23 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM CELULAR A375 APÓS 24 HORAS DE TRATAMENTO COM EXTRATO DE ALECRIM



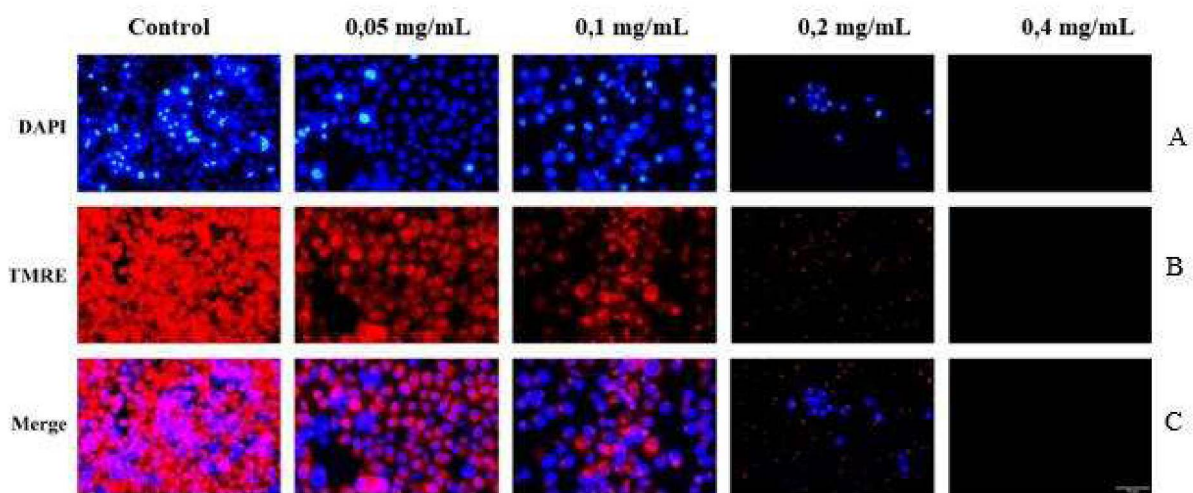
Todos os experimentos foram conduzidos independentemente em triplicata. Os dados são apresentados como média \pm DP. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de comparações múltiplas de Dunnett. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos: ($P < 0,05$); *($P < 0,01$); **($P < 0,001$); ***($P < 0,0001$).

FONTE: A autora (2026)

5.6.2 Ensaio de microscopia de fluorescência para viabilidade celular por coloração DAPI e potencial transmembranar das mitocôndrias por coloração TMRE

A Figura 24a apresenta a viabilidade celular por coloração DAPI e a Figura 24b, o potencial transmembranar das mitocôndrias por coloração TMRE. Em nosso estudo, após o tratamento, as células de melanoma apresentaram redução expressiva da intensidade de fluorescência na concentração de 0,1 mg/mL em comparação com o controle, em ambas as análises por microscopia de fluorescência. Esse resultado está em concordância com o observado no ensaio MTT, reforçando o efeito do extrato sobre a viabilidade celular.

FIGURA 24 – ENSAIO DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA PARA VIABILIDADE CELULAR POR COLORAÇÃO DAPI E POTENCIAL TRANSMEMBRANAR DAS MITOCÔNDRIAS POR COLORAÇÃO TMRE



Efeito antineoplásico do extrato de resíduo alecrim em células de melanoma cutâneo observado por microscopia de fluorescência após 24 horas de tratamento. **a.** As células A375 coradas com DAPI (azul) e **b.** TMRE (vermelho). Ampliação do microscópio = 40 \times .

FONTE: A autora (2026)

Estudos anteriores destacam que compostos fenólicos presentes no alecrim possuem atividades antitumorais significativas, incluindo ação contra células de melanoma A375. Por exemplo, Silva et al. (2025) observaram efeito antineoplásico a partir de 0,1 mg/mL do extrato etanólico de alecrim em células de melanoma cutâneo A375, utilizando microscopia de fluorescência coloração com laranja de acridina, éster etílico de tetrametilrodamina e DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) após 24 horas de tratamento. Os autores apontam o ácido rosmarínico como principal composto inibidor, embora atuando de forma sinérgica com os demais constituintes do extrato. No estudo de Huang et al. (2021) para a linhagem A375, a

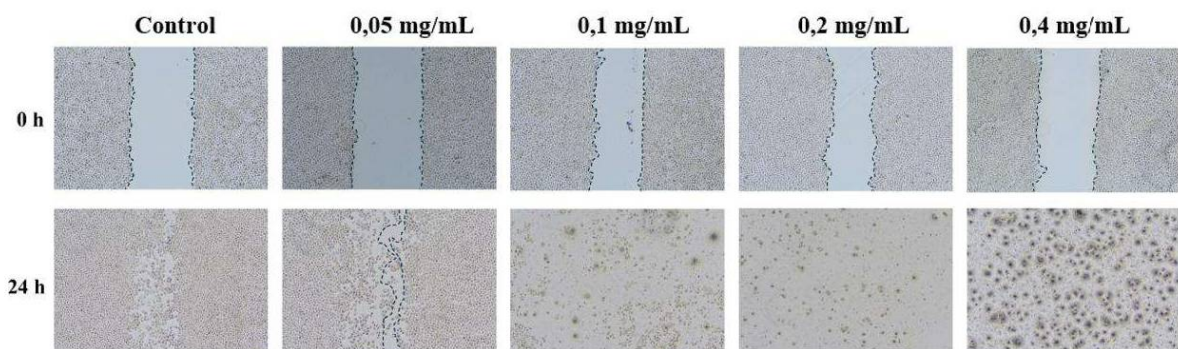
concentração de 0,050 mg/mL de ácido rosmarínico promoveu aumento significativo de células apoptóticas, evidenciado por coloração TUNEL após 48 horas.

O presente estudo evidencia que o resíduo de alecrim também apresenta propriedades antiproliferativas relevantes, comparáveis às de compostos isolados ou extraídos de alecrim fresco. Nesse contexto, sugere-se que o efeito antiproliferativo do resíduo esteja relacionado à interação sinérgica entre seus constituintes bioativos.

5.6.3 Ensaio de migração celular

O ensaio de cicatrização de feridas foi realizado para observar a migração celular. A Figura 25 mostra a migração das células do melanoma com e sem tratamento o extrato do resíduo de alecrim, em concentrações crescentes, e a respectiva análise estatística.

FIGURA 25 - MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA APÓS 24 HORAS DE TRATAMENTO COM EXTRATO DO RESÍDUO DE ALECRIM



Migração de células de melanoma após 24 horas de tratamento com extrato de alecrim. Ampliação do microscópio: 4x

FONTE: A autora (2026)

O ensaio de migração celular pelo fechamento de feridas reforça a atividade antitumoral do extrato do resíduo de alecrim. Não foi possível observar o efeito esperado de inibição celular após as 24 horas de tratamento, mas sim, morte celular significativa a partir da concentração de 0,1 mg/mL. Esse achado demonstra que o extrato apresenta desempenho expressivo mesmo em baixas concentrações.

Para esse mesmo ensaio, a inibição da migração foi encontrada para concentrações semelhantes ao do estudo na literatura. Para a mesma linhagem celular, Santos et al. (2025) observaram inibição significativa da migração com 0,1 mg/mL de extrato de alecrim após 24

horas e morte celular para concentrações acima de 0,2 mg/mL. Huang et al. (2021) verificaram, após 72 horas de ensaio, que concentrações a partir de 0,2 mg/mL de ácido rosmarínico reduzem de forma significativa a migração celular.

Borsoi et al. (2024), avaliando a linhagem SK-Mel-28, relataram diminuição significativa no fechamento da ferida em todas as concentrações testadas (0,2 a 1,6 mg/mL) de extrato de araquá-boi e ácido transcinâmico, sem apresentar morte celular. Da mesma forma, Gabin et al. (2023) demonstraram que a maior concentração de extrato de feijoa (10 mg/mL) foi capaz de inibir a migração de células SK-Mel-28, atribuindo esse efeito principalmente à presença de compostos fenólicos, em especial a flavona.

Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo — especialmente os resultados significativos já a partir de 0,1 mg/mL — mostram que o extrato do resíduo de alecrim se apresenta como uma opção tão viável e eficaz quanto os demais compostos e extratos já investigados, destacando-se inclusive pela eficácia em concentrações menores.

5.6.4 Perfil Redox (ROS, NO_x, PSH e NPSH)

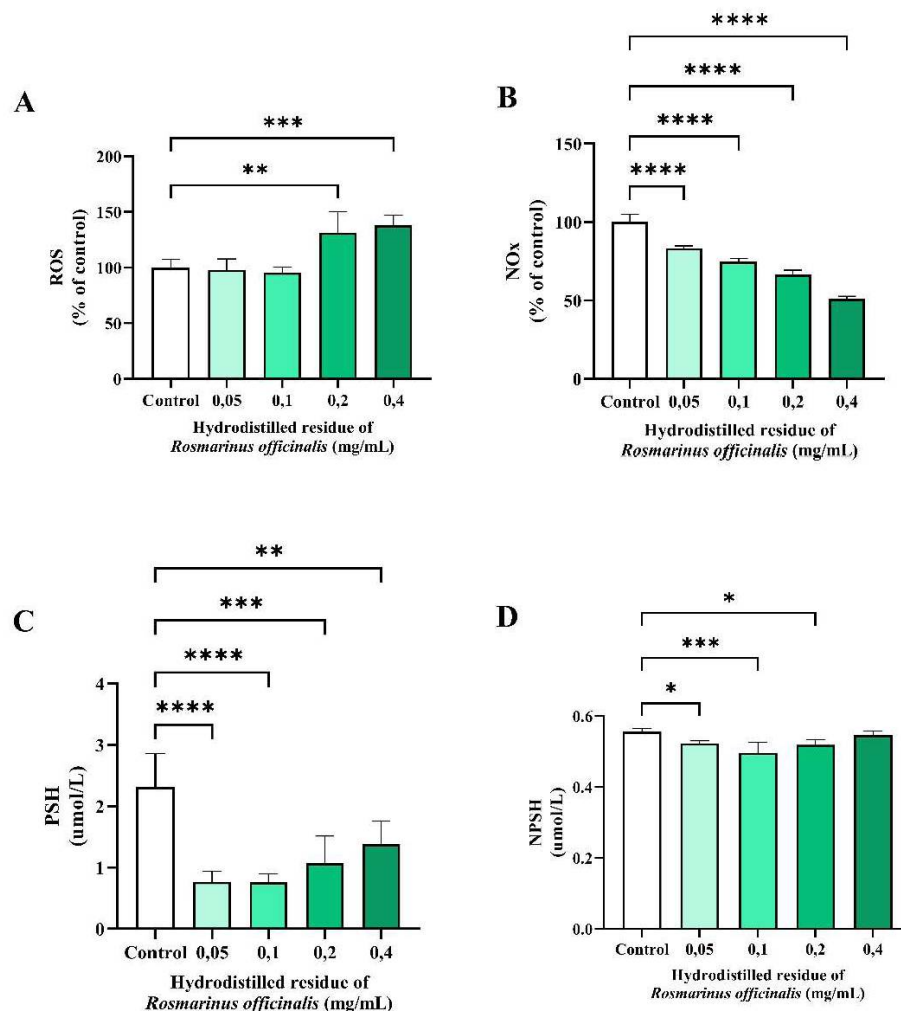
O perfil redox, avaliado pelos níveis dos marcadores de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO_x), e pelos marcadores antioxidantes tióis totais (PSH) e tióis não proteicos (NPSH) são exibidos na Figura 26.

Conforme demonstrado na Figura 26a, os compostos fenólicos presentes no extrato do resíduo hidrodestilado de alecrim promoveram aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em todas as concentrações testadas, quando comparadas ao controle. Esse aumento caracteriza um efeito pró-oxidante e indica a indução de estresse oxidativo celular. Foi observado a redução dos níveis dos níveis de óxido nítrico (NO_x) a partir da concentração 0,2 mg/mL (Figura 26b). O acúmulo de ROS pode ser acompanhado pela produção de espécies reativas de nitrogênio (RNS), como o altamente reativo ânion peroxinitrito, um oxidante forte formado pela reação de O₂⁻ e óxido nítrico (NO), dessa forma, a formação do ânion peroxinitrito leva a inativação de NO reforçando um desequilíbrio redox pró-oxidante (Piacenza et al., 2022).

Em outros estudos com células de melanoma cutâneo, observamos que, a curcumina aumentou os níveis de ROS e NO_x, atuando como pró-oxidante em células de melanoma cutâneo (Manica et al., 2023), enquanto o ácido rosmarínico não foi capaz de induzir a geração de ROS e NO_x, sendo considerado um composto antioxidante (Silva et al., 2022; Nassar et al., 2014).

Para os níveis de tióis totais (PSH) e tióis não proteicos (NPSH), mostrados na Figura 25c e 25d, houve significativa diminuição em comparação com o controle nas células de melanoma tratadas, exceto no nível mais alto, de 0,4 mg/mL, no qual não houve diferença significativa para NPSH. Isso indica que nas demais concentrações, o extrato causou uma inibição dos sistemas antioxidantes endógenos de NPSH, sugerindo a inibição do sistema antioxidante.

FIGURA 24 – DETERMINAÇÃO DO PERFIL REDOX (ROS, NO_x, PSH e NPSH) NAS CÉLULAS DE MELANOMA CUTÂNEO



Todos os experimentos foram conduzidos independentemente em triplicata. Os dados são apresentados como média \pm DP. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de comparações múltiplas de Dunnett. *($P < 0,05$); **($P < 0,01$); ***($P < 0,001$); ****($P < 0,0001$).

FONTE: A autora (2026)

6 CONCLUSÃO

Os ensaios preliminares permitiram identificar a amostra fresca de alecrim (Amostra 1) como a mais adequada, devido ao seu maior rendimento de óleo essencial ao longo da hidrodestilação. A avaliação cinética evidenciou que a maior extração ocorreu nos primeiros 30 minutos, resultando em rendimento compatível com valores reportados na literatura em 4 horas de extração. Além disso, as análises do perfil volátil indicam que o perfil volátil do óleo essencial de alecrim apresenta elevada estabilidade entre 30 minutos e 4 horas de hidrodestilação, com variações mínimas na maioria dos compostos identificados. Estudos sobre a influência do tempo de extração no rendimento e na composição química dos óleos essenciais são escassos, embora sejam fundamentais para a maximização do rendimento do óleo essencial.

As condições de extração assistida por ultrassom, especialmente as empregadas no ensaio 5, mostraram-se eficientes para a recuperação de CFT do resíduo pós-hidrodestilação, atingindo valores expressivos quando comparados à literatura. Para a variável CTF, os efeitos mais relevantes foram associados à temperatura e à sua interação com a concentração de etanol, indicando que níveis mais baixos de temperatura e concentrações mais elevadas de etanol tendem a maximizar a resposta. Em contraste, para a variável AAT, a otimização deve priorizar a redução de razão sólido-líquido e o aumento da concentração de etanol.

Os resultados obtidos na composição do perfil não volátil, indicam que a hidrodestilação removeu grande parte do ácido rosmarínico do alecrim, contudo, a vanilina foi preservada devido ao curto tempo de hidrodestilação aplicado. Os demais compostos quantificados foram o ácido cafeico, ácido p-cumárico e ácido gálico.

Os resultados sobre o efeito antitumoral demonstram que o extrato obtido do resíduo de alecrim apresenta expressiva atividade citotóxica sobre células de melanoma A375, em concordância com achados prévios da literatura. A redução da viabilidade celular, confirmada tanto pelo ensaio MTT quanto pela microscopia de fluorescência, a redução do potencial transmembranar das mitocôndrias, associada à significativa morte celular no ensaio de feridas já em baixas concentrações, evidencia o potencial biológico do resíduo como fonte de compostos bioativos com ação antitumoral. Ainda, o aumento dos níveis de ROS e a diminuição dos níveis dos marcadores antioxidantes PSH e NPSH evidenciam o aumento do estresse oxidativo e a ação pró-oxidante. Esses efeitos, provavelmente decorrentes da atuação sinérgica entre seus constituintes fenólicos (Vanilina, Ácido Cafeico, Ácido p-Cumárico, Ácido Gálico e Ácido Rosmarínico), indicam que o resíduo de alecrim pode ser uma alternativa promissora

e sustentável para o desenvolvimento de agentes terapêuticos voltados ao controle da proliferação e migração de células de melanoma.

REFERÊNCIAS

- AKHTAZAD, Sharareh; GHOTBEDDIN, Zohreh; TABANDEH, Mohammad Reza; *et al.* Alpha-pinene ameliorate behavioral deficit induced by early postnatal hypoxia in the rat: study the inflammatory mechanism. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 6416, 2024.
- ALAM, Manzar et al. Therapeutic potential of ursolic acid in cancer and diabetic neuropathy diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 22, p. 12162, 2021.
- ALI, Ameena et al. Volatile and polyphenol composition, anti-oxidant, anti-diabetic and anti-aging properties, and drying kinetics as affected by convective and hybrid vacuum microwave drying of *Rosmarinus officinalis* L. **Industrial Crops and Products**, v. 151, p. 112463, 2020.
- ALI, Ameena; CHUA, Bee Lin; CHOW, Yin Hui. An insight into the extraction and fractionation technologies of the essential oils and bioactive compounds in *Rosmarinus officinalis* L.: past, present and future. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 338-351, 2019.
- ALJABALI, Alaa A. A.; OBEID, Mohammad A.; BASHATWAH, Rasha M.; *et al.* Phytochemicals in Cancer Therapy: A Structured Review of Mechanisms, Challenges, and Progress in Personalized Treatment. **Chemistry & Biodiversity**, v. 22, n. 8, p. e202402479, 2025.
- ALSAMRI, Halima et al. Carnosol is a novel inhibitor of p300 acetyltransferase in breast cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 664403, 2021.
- ANGELI, Lucrezia; MOROZOVA, Ksenia. SCAMPICCHIO, MAATeo. A kinetic-based stopped-flow DPPH' method. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1. p. 7621, 2023.
- ARRUDA, H. S. et al. Determination of free, esterified, glycosylated and insolublebound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 245, n. December 2017, p. 738749, 2018.
- ASMA, Umme et al. A Kinetic Approach to Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC): Restoring Order to the Antioxidant Activity of Hydroxycinnamic Acids and Fruit Juices. **Antioxidants**, v. 13, n. 2, p. 222, 2024.
- AYELESO, Taiwo Betty; MATUMBA, Mashudu Given; MUKWEVHO, Emmanuel. Oleonic acid and its derivatives: biological activities and therapeutic potential in chronic diseases. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1915, 2017.
- AYYILDIZ, Sena Saklar; PELVAN, Ebru; KARADENIZ, Bulent. Optimization of accelerated solvent extraction, ultrasound assisted and supercritical fluid extraction to obtain carnosol, carnosic acid and rosmarinic acid from rosemary. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 37, p. 101422, 2024.
- AZIZ, Ejaz et al. Rosemary species: a review of phytochemicals, bioactivities and industrial applications. **South African Journal of Botany**, v. 151, p. 3-18, 2022.

BAER-DUBOWSKA, Wanda; NAROŻNA, Maria; KRAJKA-KUŹNIAK, Violetta. Anti-cancer potential of synthetic oleanolic acid derivatives and their conjugates with NSAIDs. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 4957, 2021.

BAO, Youmei et al. Synergistic chemotherapy for breast cancer and breast cancer brain metastases via paclitaxel-loaded oleanolic acid nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 17, n. 4, p. 1343-1351, 2020.

BARP, Laura; VIŠNJEVEC, Ana Miklavčič; MORET, Sabrina. Pressurized Liquid Extraction: A powerful tool to implement extraction and purification of food contaminants. **Foods**, v. 12, n. 10, p. 2017, 2023.

BENDIF, Hamdi et al. Rosmarinus eriocalyx: An alternative to Rosmarinus officinalis as a source of antioxidant compounds. **Food chemistry**, v. 218, p. 78-88, 2017.

BERNARDINI, Leticia; BARBOSA, Eduardo; CHARÃO, Mariele Feiffer; et al. Oxidative damage, inflammation, genotoxic effect, and global DNA methylation caused by inhalation of formaldehyde and the purpose of melatonin. **Toxicology Research**, v. 9, n. 6, p. 778–789, 2021.

BERNATONIENE, Jurga et al. Novel approaches to optimize extraction processes of ursolic, oleanolic and rosmarinic acids from Rosmarinus officinalis leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 72-79, 2016.

BIRTIC, Simona et al. Carnosic acid. **Phytochemistry**, v. 115, p. 9-19, 2015.

BORSOI, Felipe Tecchio; DA SILVA, Gilnei Bruno; MANICA, Daiane; et al. Extract of Araçá-Boi and Its Major Phenolic Compound, Trans-Cinnamic Acid, Reduce Viability and Inhibit Migration of Human Metastatic Melanoma Cells. **Nutrients**, v. 16, n. 17, p. 2929, 2024.

BORRÁS-LINARES, Isabel et al. Rosmarinus officinalis leaves as a natural source of bioactive compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p. 20585-20606, 2014.

BOUAMMALI, Haytham et al. Rosemary as a Potential Source of Natural Antioxidants and Anticancer Agents: A Molecular Docking Study. **Plants**, v. 13, n. 1, p. 89, 2023.

BOUFETACHA, Meryem et al. Study of essential oil extraction from Moroccan Rosmarinus officinalis L. by distillation based on quantum chemical calculation and molecular dynamics simulation. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, p. 1-19, 2024.

BOUSBIA, Nabil; ABERT VIAN, Maryline; FERHAT, Mohamed A.; et al. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 355–362, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

CHAN, Eric Wei Chiang; WONG, Siu Kuin; CHAN, Hung Tuck. An overview of the chemistry and anticancer properties of rosemary extract and its diterpenes. **Journal of Herbmmed Pharmacology**, v. 11, n. 1, p. 10-19, 2021.

CHEN, Hanyue et al. Optimization extraction of rosemary essential oils using hydrodistillation with extraction kinetics analysis. **Food Science & Nutrition**, v. 9, n. 11, p. 6069-6077, 2021.

CHENG, An-Chin et al. Rosmanol potently induces apoptosis through both the mitochondrial apoptotic pathway and death receptor pathway in human colon adenocarcinoma COLO 205 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 2, p. 485-493, 2011.

CHOUDHARI, Amit S.; MANDAVE, Pallavi C.; DESHPANDE, Manasi; *et al.* Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1614, 2020.

CHOUHAN, Kavi Bhushan Singh et al. Critical analysis of microwave hydrodiffusion and gravity as a green tool for extraction of essential oils: Time to replace traditional distillation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 92, p. 12-21, 2019.

CHRISTAKI, Stamatia; BOULOUMPASI, Elisavet; LALIDOU, Eleni; *et al.* Bioactive Profile of Distilled Solid By-Products of Rosemary, Greek Sage and Spearmint as Affected by Distillation Methods. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 9058, 2022.

CHRISTOPOULOU, Spyridoula D. et al. Rosemary extract and essential oil as drink ingredients: An evaluation of their chemical composition, genotoxicity, antimicrobial, antiviral, and antioxidant properties. **Foods**, v. 10, n. 12, p. 3143, 2021.

COCAN, Ileana; ALEXA, Ersilia; DANCIU, Corina; *et al.* Phytochemical screening and biological activity of Lamiaceae family plant extracts. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 2017.

CONDE-HERNÁNDEZ, Lilia A.; ESPINOSA-VICTORIA, José R.; TREJO, Arturo; *et al.* CO₂-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **Journal of Food Engineering**, v. 200, p. 81–86, 2017.

D'AMATO, Serena et al. Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. **Food Control**, v. 86, p. 126-137, 2018.

DE ELGUEA-CULEBRAS, G.O.; PANAMÁ-TAPIA, L.A.; MELERO-BRAVO, E.; *et al.* Comparison of the phenolic composition and biological capacities of wastewater from *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia lavandulifolia* Vahl. and *Thymus mastichina* L. resulting from two hydrodistillation systems: Clevenger and MAE. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 34, p. 100480, 2023.

DE ELGUEA-CULEBRAS, Gonzalo Ortiz; BRAVO, Enrique Melero; SÁNCHEZ-VIOQUE, Raúl. Potential sources and methodologies for the recovery of phenolic compounds from distillation residues of Mediterranean aromatic plants. An approach to the valuation of by-products of the essential oil market—A review. **Industrial Crops and Products**, v. 175, p. 114261, 2022.

DEL PILAR SANCHEZ-CAMARGO, Andrea et al. Two-step sequential supercritical fluid extracts from rosemary with enhanced anti-proliferative activity. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 293-303, 2014.

DHOUBI, Nedra; MANUGUERRA, Simona; ARENA, Rosaria; *et al.* Impact of the Extraction Method on the Chemical Composition and Antioxidant Potency of *Rosmarinus officinalis* L. Extracts. **Metabolites**, v. 13, n. 2, p. 290, 2023.

DHILLON, Navneet; AGGARWAL, Bharat B.; NEWMAN, Robert A.; *et al.* Phase II Trial of Curcumin in Patients with Advanced Pancreatic Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 14, p. 4491–4499, 2008.

DI MARTILE, Marta *et al.* Essential oils and their main chemical components: The past 20 years of preclinical studies in melanoma. **Cancers**, v. 12, n. 9, p. 2650, 2020.

EL SALA, Amine Ali *et al.* Rosemary essential oil potentiates the antitumour activity of 5-fluorouracil in human colorectal carcinoma cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 76, n. 6, p. 691-700, 2024.

ELYEMNI, Majda *et al.* Extraction of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. by two different methods: Hydrodistillation and microwave assisted hydrodistillation. **The Scientific World Journal**, v. 2019, n. 1, p. 3659432, 2019.

ESPÍNDOLA, Kaio Murilo Monteiro *et al.* Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 541, 2019.

FEJÉR, Jozef *et al.* Seasonal variability of *Juniperus communis* L. berry ethanol extracts: 2. In vitro ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 9027, 2022.

FERREIRA, Daniele F. *et al.* Solvent-free simultaneous extraction of volatile and non-volatile antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by microwave hydrodiffusion and gravity. **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 112094, 2020.

FILLY, Aurore; FERNANDEZ, Xavier; MINUTI, Matteo; *et al.* Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: From laboratory to pilot and industrial scale. **Food Chemistry**, v. 150, p. 193–198, 2014.

FLIEGER, Jolanta; FLIEGER, Michał. The [DPPH•/DPPH-H]-HPLC-DAD method on tracking the antioxidant activity of pure antioxidants and goutweed (*Aegopodium podagraria* L.) hydroalcoholic extracts. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 6005, 2020.

FRAGUELA-MEISSIMILLY, Horacio *et al.* New trends in supercritical fluid technology and pressurized liquids for the extraction and recovery of bioactive compounds from agro-industrial and marine food waste. **Molecules**, v. 28, n. 11, p. 4421, 2023.

FUJII, Wataru *et al.* Syntheses of prodelphinidin B1, B2, and B4 and their antitumor activities against human PC-3 prostate cancer cell lines. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 52, p. 7188-7192, 2013.

GAMBIN, Larissa De Bona; CAVALI, Matheus; DRESCH, Aline Perin; *et al.* Phenolic compounds from feijoa (*Acca sellowiana*) fruits: Ultrasound-assisted extraction and antiproliferative effect on cutaneous melanoma cells (SK-MEL-28). **Food Bioscience**, v. 55, p. 103078, 2023.

GARCEA, Giuseppe; BERRY, David P.; JONES, Donald J.L.; *et al.* Consumption of the Putative Chemopreventive Agent Curcumin by Cancer Patients: Assessment of Curcumin

Levels in the Colorectum and their Pharmacodynamic Consequences. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 1, p. 120–125, 2005.

GARCIA, Patrick Jay B.; HUANG, Steven Kuan-Hua; DE CASTRO-CRUZ, Kathlia A.; *et al.* An In Vitro Evaluation and Network Pharmacology Analysis of Prospective Anti-Prostate Cancer Activity from *Perilla frutescens*. **Plants**, v. 12, n. 16, p. 3006, 2023.

GOLMAKANI, Mohammad-Taghi; REZAEI, Karamatollah. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. **Food chemistry**, v. 109, n. 4, p. 925–930, 2008.

GOLOMBICK, Terry; DIAMOND, Terrence H.; MANOHARAN, Arumugam; *et al.* The Effect of Curcumin (as Meriva) on Absolute Lymphocyte Count (ALC), NK Cells and T Cell Populations in Patients with Stage 0/1 Chronic Lymphocytic Leukemia. **Journal of Cancer Therapy**, v. 6, n. 7, p. 566–571, 2015.

GONZÁLEZ-RIVERA, José *et al.* Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): Chemical composition and thermal analysis. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 33, p. 308–318, 2016.

GLOWACZ, Klaudia *et al.* Excitation–emission matrix fluorescence spectroscopy for cell viability testing in UV-treated cell culture. **RSC advances**, v. 12, n. 13, p. 7652–7660, 2022.

GULCIN, İlhami; ALWASEL, Saleh H. DPPH radical scavenging assay. **Processes**, v. 11, n. 8, p. 2248, 2023.

GUNAWARDENA, Harshi; SILVA, Renuka; RANASINGHE, Pathmasiri. Human plasma dynamically quenches the fluorescein at the initial point of oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. **BMC Research Notes**, v. 12, p. 1–5, 2019.

HAMMERBACHER, Almuth *et al.* Gallocatechin biosynthesis via a flavonoid 3', 5'-hydroxylase is a defense response in Norway spruce against infection by the bark beetle-associated sap-staining fungus *Endoconidiophora polonica*. **Phytochemistry**, v. 148, p. 78–86, 2018.

HANSSSENS, Jay; MENESES, Diego; SAYA, Jordy M.; *et al.* Terpenes and Terpenoids: How can we use them? **European Journal of Organic Chemistry**, v. 28, n. 24, p. e202401151, 2025.

HAO, Y. *et al.* Matrine induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Oncology Letters**, 22 jul. 2019.

HASHEMI, Seyed Mohammad Bagher; GHOLAMHOSSEINPOUR, Aliakbar; BARBA, Francisco J. *Rosmarinus officinalis* L. essential oils impact on the microbiological and oxidative stability of Sarshir (Kaymak). **Molecules**, v. 28, n. 10, p. 4206, 2023.

HERRERO, Miguel *et al.* Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2512–2520, 2010.

HIEN, Tran Thien; BINH, Hoang Quang; LONG, Huynh Bao; et al. Evaluation of Influencing Factors and Technological Processes for the Production of Orange Essential Oil (*Citrus sinensis*) on Equipment Semi-industrial Distillation. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 742, 2022.

HOFF, Rodrigo Barcellos; PIZZOLATO, Tânia Mara. Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: A review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 109, p. 83-96, 2018.

HUANG, Yeqin et al. Chemical diversity and antimelanoma potential of rosemary essential oils: Unveiling mechanistic insights through quantitative proteomics. **Industrial Crops and Products**, v. 215, p. 118652, 2024.

HUANG, Lin; CHEN, Jiangyan; QUAN, Jin; *et al.* Rosmarinic acid inhibits proliferation and migration, promotes apoptosis and enhances cisplatin sensitivity of melanoma cells through inhibiting ADAM17/EGFR/AKT/GSK3 β axis. **Bioengineered**, v. 12, n. 1, p. 3065–3076, 2021.

HUDAIB, Mohammad M.; ABU HAJAL, Abdallah F.; SAKKAL, Mohammad M. Chemical composition of the volatile oil from aerial parts of *Rosmarinus officinalis* L. growing in UAE. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 25, n. 2, p. 282-289, 2022.

IRAKLI, Maria et al. Sustainable recovery of phenolic compounds from distilled rosemary by-product using green extraction methods: optimization, comparison, and antioxidant activity. **Molecules**, v. 28, n. 18, p. 6669, 2023.

IRAKLI, Maria; SKENDI, Adriana; BOULOUMPASI, Elisavet; *et al.* LC-MS Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Solid Residues from the Essential Oil Industry. **Antioxidants**, v. 10, n. 12, p. 2016, 2021.

JACOTET-NAVARRO, Magali et al. Ultrasound versus microwave as green processes for extraction of rosmarinic, carnosic and ursolic acids from rosemary. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 27, p. 102-109, 2015.

JÄGER, Sebastian et al. Pentacyclic triterpene distribution in various plants–rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2016-2031, 2009.

JIA, Wenhui; ZHOU, Li; LI, Lei; *et al.* Nano-Based Drug Delivery of Polyphenolic Compounds for Cancer Treatment: Progress, Opportunities, and Challenges. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 1, p. 101, 2023.

JOHNSON, Jeremy J. Carnosol: a promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. **Cancer letters**, v. 305, n. 1, p. 1-7, 2011.

JOSHI, Dinesh C.; BAKOWSKA, Joanna C. SPG20 protein spartin associates with cardiolipin via its plant-related senescence domain and regulates mitochondrial Ca²⁺ homeostasis. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e19290, 2011.

JUSTUS, Calvin R. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 88, p. 51046, 2014.

KALPOUTZAKIS, Eleftherios et al. Determination of the total phenolics content and antioxidant activity of extracts from parts of plants from the Greek Island of Crete. **Plants**, v. 12, n. 5, p. 1092, 2023.

KARAGIANNI, Korina et al. Carnosic acid and carnosol display antioxidant and anti-prion properties in in vitro and cell-free models of prion diseases. **Antioxidants**, v. 11, n. 4, p. 726, 2022.

KASHYAP, Dharambir; TULI, Hardeep Singh; SHARMA, Anil K. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. **Life sciences**, v. 146, p. 201-213, 2016.

KHOSHNAZAR, Mahdiah; PARVARDEH, Siavash; BIGDELI, Mohammad Reza. Alpha-pinene exerts neuroprotective effects via anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 29, n. 8, p. 104977, 2020.

KONTOGIANNI, Vassiliki G. et al. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. **Food chemistry**, v. 136, n. 1, p. 120-129, 2013.

KOMERS, Radko; ANDERSON, Sharon. Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 284, n. 6, p. F1121–F1137, 2003.

KORANEEKIT, Amonrat et al. Synergistic effects of cisplatin-caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells via the mitochondrial pathways. **Oncology Letters**, v. 15, n. 5, p. 7397-7402, 2018.

KORANEEKIT, Amonrat. et al. Synergistic effects of cisplatin–caffeic acid on cervical cancer cell lines. **European Journal of Cancer**, v. 60, p. e6, 2016.

KOWALCZYK, Adam; TUBEROSO, Carlo Ignazio Giovanni; JERKOVIĆ, Igor. The Role of Rosmarinic Acid in Cancer Prevention and Therapy: Mechanisms of Antioxidant and Anticancer Activity. **Antioxidants**, v. 13, n. 11, p. 1313, 2024.

KWAŚNIEWSKA-KAROLAK, Izabella; MOSTOWSKI, Radosław. Effect of different drying processes on an antioxidant potential of three species of the family. **Herba Polonica**, v. 67, n. 1, p. 8-17, 2021.

KUMAR, Ayush; UMAMA, Yezdani; KHAN, Mohammad Gayoor. The Scenario of Pharmaceuticals and Development of Microwave Assisted Extraction Techniques. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 7, p. 1105-1134, 2019.

KUTTAN, Ramadasan; SUDHEERAN, P.C.; JOSPH, C.D. Turmeric and Curcumin as Topical Agents in Cancer Therapy. **Tumori Journal**, v. 73, n. 1, p. 29–31, 1987.

LAGOA, Ricardo; SILVA, João; RODRIGUES, Joaquim Rui; *et al.* Advances in phytochemical delivery systems for improved anticancer activity. **Biotechnology Advances**, v. 38, p. 107382, 2020.

LAINA, Konstantina M. et al. Process design for the extraction of bioactive compounds from several mediterranean medicinal plants. **Chemical Engineering Transactions**, v. 86, p. 1327-1332, 2021.

LEFEBVRE, Thibault; DESTANDAU, Emilie; LESELLIER, Eric. Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. **Journal of Chromatography A**, v. 1635, p. 461770, 2021.

LEŠNIK, Samo; FURLAN, Veronika; BREN, Urban. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): extraction techniques, analytical methods and health-promoting biological effects. **Phytochemistry Reviews**, v. 20, n. 6, p. 1273-1328, 2021.

LOPES, Joana; RODRIGUES, Cecília M. P.; GASPAR, Maria Manuela; *et al.* Melanoma Management: From Epidemiology to Treatment and Latest Advances. **Cancers**, v. 14, n. 19, p. 4652, 2022.

LU, Xirong et al. Inhibition of NF- κ B is required for oleanolic acid to downregulate PD-L1 by promoting DNA demethylation in gastric cancer cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 1, p. e22621, 2021.

MALINI, G.; SARANYA, B.; PARAMESWARI, Angala. Review on extraction techniques for medicinal and aromatic plants. **Int J Pharm Chem Anal**, 2023.

MANICA, D. et al. Curcumin promotes apoptosis of human melanoma cells by caspase 3. **Cell Biochemistry and Function**, v. 41, n. 8, p. 1295–1304, dez. 2023.

MANSUR, Ahmad Rois et al. Phenolic compounds in common buckwheat sprouts: composition, isolation, analysis and bioactivities. **Food Science and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 935-956, 2022.

MATEJCZYK, Marzena et al. Cytotoxic, genotoxic and antimicrobial activity of caffeic and rosmarinic acids and their lithium, sodium and potassium salts as potential anticancer compounds. **Advances in medical sciences**, v. 63, n. 1, p. 14-21, 2018.

MCGAHON, Anne J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods in cell biology**, v. 46, p. 153-185, 1995.

MENA, Pedro et al. Phytochemical profiling of flavonoids, phenolic acids, terpenoids, and volatile fraction of a rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1576, 2016.

MIN, Kyoung-jin; JUNG, Kyong-Jin; KWON, Taeg Kyu. Carnosic acid induces apoptosis through reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress induction in human renal carcinoma caki cells. **Journal of cancer prevention**, v. 19, n. 3, p. 170, 2014.

MOORE, Jessy; YOUSEF, Michael; TSIANI, Evangelia. Anticancer effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and rosemary extract polyphenols. **Nutrients**, v. 8, n. 11, p. 731, 2016.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MYERS, Raymond H.; MONTGOMERY, Douglas C.; ANDERSON-COOK, Christine. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. 3. ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2009. (Wiley series in probability and statistics).

NASSAR, Mohannad; HIRAISHI, Noriko; SHIMOKAWA, Hitoyata; et al. The inhibition effect of non-protein thiols on dentinal matrix metalloproteinase activity and HEMA cytotoxicity. **Journal of Dentistry**, v. 42, n. 3, p. 312–318, 2014.

NAVARRETE, A. et al. Valorization of solid wastes from essential oil industry. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 2, p. 196-201, 2011.

NAZLIĆ, Marija et al. Endemic *Veronica saturejoides* Vis. ssp. *saturejoides*—Chemical composition and antioxidant activity of free volatile compounds. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1646, 2020.

O'NEILL, Eric J. et al. Anticancer properties of carnosol: a summary of in vitro and in vivo evidence. **Antioxidants**, v. 9, n. 10, p. 961, 2020.

OLASCUAGA-CASTILLO, Karyn Alicia; CASTILLO-MEDINA, Olga; VILLACORTA-ZAVALETA, Marleni; et al. Extraction of essential oils by hydrodistillation of four aromatic species: Conditioning, extraction conditions, yield and chemical composition. **Scientia Agropecuaria**, v. 15, n. 3, p. 385–408, 2024.

OREOPOULOU, Antigoni; CHOULITOU, Evanthia; TSIMOGLIANNIS, Dimitrios; et al. Six Common Herbs with Distinctive Bioactive, Antioxidant Components. A Review of Their Separation Techniques. **Molecules**, v. 26, n. 10, p. 2920, 2021.

PANDA, Siva S.; THANGARAJU, Muthusamy; LOKESHWAR, Bal L. Ursolic acid analogs as potential therapeutics for cancer. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8981, 2022.

PDQ Integrative, Alternative, and Complementary Therapies Editorial Board. Curcumin (Curcuma, Turmeric) and Cancer (PDQ®): Health Professional Version. **PDQ Cancer Information Summaries**, National Cancer Institute (US), 2024.

PELINSON, Luana Paula et al. Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells. **Molecular biology reports**, v. 46, p. 2085-2092, 2019.

PIACENZA, Lucía; ZEIDA, Ari; TRUJILLO, Madia; et al. The superoxide radical switch in the biology of nitric oxide and peroxynitrite. **Physiological Reviews**, v. 102, n. 4, p. 1881–1906, 2022.

PSARROU, Irimi et al. Extraction kinetics of phenolic antioxidants from the hydro distillation residues of rosemary and effect of pretreatment and extraction parameters. **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 4520, 2020.

PEREZ-VAZQUEZ, Ana et al. Pressurized liquid extraction for the recovery of bioactive compounds from seaweeds for food industry application: a review. **Antioxidants**, v. 12, n. 3, p. 612, 2023.

PETIWALA, Sakina M.; JOHNSON, Jeremy J. Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity. **Cancer letters**, v. 367, n. 2, p. 93-102, 2015.

RADZIEJEWSKA, I. et al. Rosmarinic acid influences collagen, MMPs, TIMPs, glycosylation and MUC1 in CRL-1739 gastric cancer cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 397-407, 2018.

RIBEIRO, P. R. E. et al. Chemical composition and antioxidant activity in the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* Nees with medicinal interest. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 14, n. 7, p. 326-330, 2020.

RODRÍGUEZ-ROJO, Soraya et al. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 1, p. 98-103, 2012.

RUSSO, Alessandra; LOMBARDO, Laura; TRONCOSO, Nicolas; *et al.* *Rosmarinus officinalis* Extract Inhibits Human Melanoma Cell Growth. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 12, p. 1934578X0900401220, 2009.

SACRAMENTO, Veronica De Melo; VELOSO, Pedro Henrique Fonseca; ROYO, Vanessa De Andrade; et al. **Métodos para determinação de capacidade antioxidante**. 1. ed. [s.l.]: Atena Editora, 2023.

SADOWSKA, Urszula et al. The effect of drying methods on the concentration of compounds in sage and thyme. **Journal of food processing and preservation**, v. 41, n. 6, p. e13286, 2017.

SANTANA-MÉRIDAS, O.; POLISSIOU, M.; IZQUIERDO-MELERO, M.E.; *et al.* Polyphenol composition, antioxidant and bioplagueicide activities of the solid residue from hydrodistillation of *Rosmarinus officinalis* L. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 125–134, 2014.

SCHERER, Rodrigo; GODOY, Helena Teixeira. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 654–658, 2009.

SEIDI DAMYEH, Maral et al. Microwave and ohmic heating impact on the in situ hydrodistillation and selective extraction of *Satureja macrosiphonia* essential oil. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 40, n. 4, p. 647-656, 2016.

SKENDI, Adriana; IRAKLI, Maria; CHATZOPOULOU, Paschalina. Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 6, p. 62–69, 2017.

SELVAMUTHUKUMARAN, M.; SHI, John. Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. **Food Quality and Safety**, v. 1, n. 1, p. 61-81, 2017.

SEO, Dae Yun et al. Ursolic acid in health and disease. **The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology**, v. 22, n. 3, p. 235, 2018.

SHARMA, Shubham et al. Encapsulation of essential oils in nanocarriers for active food packaging. **Foods**, v. 11, n. 15, p. 2337, 2022.

SHARMA, Yashaswini et al. Full-spectrum analysis of bioactive compounds in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) as influenced by different extraction methods. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4599, 2020.

SHEN, Lipeng; PANG, Shuixiu; ZHONG, Mingming; et al. A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 101, p. 106646, 2023.

SIGMA-ALDRICH. Figura 1 - principais compostos voláteis do óleo essencial de alecrim [Imagem]. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/1%2C8-cineol?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=1%2C8-cineol&type=product>.

SIGMA-ALDRICH. Figura 2 - principais compostos não voláteis do extrato de alecrim alecrim [Imagem]. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/galocatechin?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=galocatechin&type=product>.

SILVA, Andrea Alice et al. Priming astrocytes with TNF enhances their susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection and creates a self-sustaining inflammatory milieu. **Journal of neuroinflammation**, v. 14, p. 1-15, 2017.

SINGLETON, Vernon L.; ORTHOFER, Rudolf; LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1999. p. 152-178.

SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A. R. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SIRAJUDEEN, Fazila et al. Exploring the Potential of Rosemary Derived Compounds (Rosmarinic and Carnosic Acids) as Cancer Therapeutics: Current Knowledge and Future Perspectives. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 32, n. 1, p. 38, 2024.

SKENDI, Adriana et al. Comparison of drying methods for the retention of phenolic antioxidants in post-distillation solid residues of aromatic plants. **LWT**, v. 189, p. 115463, 2023.

SORINO, Cristina; IEZZI, Simona; CIUFFREDA, Ludovica; *et al.* Immunotherapy in melanoma: advances, pitfalls, and future perspectives. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 11, p. 1403021, 2024.

SPADI, Agnese; ANGELONI, Giulia; GUERRINI, Lorenzo; *et al.* Using a Plackett–Burman design to maximise yield of rosemary essential oil by distillation. **Industrial Crops and Products**, v. 166, p. 113488, 2021.

SPIEGEL, Maciej et al. Antioxidant activity of selected phenolic acids–ferric reducing antioxidant power assay and QSAR analysis of the structural features. **Molecules**, v. 25, n. 13, p. 3088, 2020.

SUWEI, Dong et al. Metformin inhibits melanoma cell metastasis by suppressing the miR-5100/SPINK5/STAT3 axis. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 27, n. 1, p. 48, 2022.

ŚWISŁOCKA, Renata. Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV absorption, ¹H and ¹³C NMR) and theoretical (in B3LYP/6-311++ G** level) studies on alkali metal salts of caffeic acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 100, p. 21-30, 2013.

TATSCH, Etiane; BOCHI, Guilherme Vargas; PEREIRA, Renata Da Silva; *et al.* A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 348–350, 2011.

TAVARES, Cláudia S. et al. Hydrolates: A review on their volatiles composition, biological properties and potential uses. **Phytochemistry Reviews**, v. 21, n. 5, p. 1661-1737, 2022.

TSUKAMOTO, Yuta et al. Rosmarinic acid is a novel inhibitor for Hepatitis B virus replication targeting viral epsilon RNA-polymerase interaction. **PLoS One**, v. 13, n. 5, p. e0197664, 2018.

TYAGI, Amit K.; MALIK, Anushree. Bactericidal action of lemon grass oil vapors and negative air ions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 13, p. 169–177, 2012.

VALENTE, João Vasco et al. Humulus lupulus aqueous extract and hydrolate as a potential ingredient for cosmetics: chemical characterization and in vitro antimicrobial, cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory assessment. **Fitoterapia**, v. 175, p. 105861, 2024.

VÁZQUEZ, Erika et al. Simultaneous extraction of rosemary and spinach leaves and its effect on the antioxidant activity of products. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 82, p. 138-145, 2013.

VIEITEZ, Ignacio et al. Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 58-64, 2018.

WANG, Zehao et al. Solvent-free microwave extraction of essential oil and hydrosol from fresh leaves of *Cinnamomum burmannii* (Nees et T. Nees) Blume after screw extrusion treatment and evaluation of pancreatic lipase inhibitory activities in vitro compared to its main components. **Industrial Crops and Products**, v. 202, p. 116983, 2023.

XIE, Lixia et al. Fast quantitative determination of principal phenolic anti-oxidants in rosemary using ultrasound-assisted extraction and chemometrics-enhanced HPLC–DAD Method. **Food Analytical Methods**, v. 16, n. 2, p. 386-400, 2023.

ZHANG, Huangxian et al. Extraction of camphor tree essential oil by steam distillation and supercritical CO₂ extraction. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5385, 2022.

ZHANG, Ling et al. Ursolic acid suppresses the invasive potential of colorectal cancer cells by regulating the TGF-β1/ZEB1/miR-200c signaling pathway. **Oncology Letters**, v. 18, n. 3, p. 3274-3282, 2019.

ZIANI, Imane; BOUAKLINE, Hamza; YAHYAOU, Meryem Idrissi; *et al.* The effect of ethanol/water concentration on phenolic composition, antioxidant, and antimicrobial activities

of *Rosmarinus tournefortii* de Noé hydrodistillation solid residues. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 17, n. 2, p. 1602–1615, 2023.

ZORIĆ, Nataša et al. Protective effects of olive oil phenolics oleuropein and hydroxytyrosol against hydrogen peroxide-induced DNA damage in human peripheral lymphocytes. **Acta Pharmaceutica**, v. 71, n. 1, p. 131-141, 2021.