



Avaliação do teor total de flavonoides, do potencial antioxidante e do perfil de compostos voláteis de infusões de “quebra-pedra” (*Phyllanthus niruri*)

Assessment of total flavonoid content, antioxidant potential, and volatile compound profile of “quebra-pedra” (*Phyllanthus niruri*) infusions

K. G. N. Oliveira^{1*}; L. J. S. Pinto²; S. S. Monteiro³; A. V. V. Montarroyos⁴;
J. P. G. Ferreira¹; R. F. A. Moreira^{1,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da UNIRIO, 22290-450, Rio de Janeiro-RJ, Brasil

²Faculdade de Formação de Professores / Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 24435-005, São Gonçalo-RJ, Brasil

³Fórum Itaboraí/ FIOCRUZ, 25730-310, Petrópolis-RJ, Brasil

⁴Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife-PE, Brasil

⁵Laboratório de Avaliação da Composição e Aroma de Produtos Alimentícios (LACAPA), Departamento de Saúde Coletiva, Instituto Biomédico, 20211-040, Rio de Janeiro-RJ, Brasil

*kellygno@edu.unirio.br

(Recebido em 19 de novembro de 2025; aceito em 14 de junho de 2026)

A espécie *Phyllanthus niruri* L. (“quebra-pedra”) tem grande potencial fitoterápico, sendo empregada para o tratamento de diversas patologias. Essa erva é consumida principalmente na forma de infusão. O objetivo do presente trabalho é avaliar o teor total de flavonoides (método do cloreto de alumínio), a capacidade antioxidante (Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS e FRAP) e o perfil de compostos orgânicos voláteis (microextração em fase sólida) de infusões de *P. niruri* produzidas a partir de amostras de referência ou comerciais. Os resultados mostraram que os flavonoides parecem ter uma influência substancial sobre o potencial antioxidante dessas infusões de *P. niruri*, principalmente naquelas originárias das amostras de referência. As infusões das folhas das amostras de referência destacam-se quanto ao potencial antioxidante, principalmente quando medido através do ensaio FRAP. Esse estudo apresenta dados inéditos sobre o perfil de compostos voláteis das infusões de *P. niruri*. Foram identificados trinta e sete compostos orgânicos voláteis no conjunto das infusões analisadas, com destaque para o grupo dos ésteres (14 representantes), hidrocarbonetos (6) e compostos terpênicos oxigenados (6).

Palavras-chave: *Phyllanthus niruri*, capacidade antioxidante, fração volátil.

Phyllanthus niruri L. (stonebreaker) is a medicinal plant with significant phytotherapeutic potential; it is widely used for the treatment of various diseases. This herb is mainly consumed in the form of an infusion. The objective of this study was to evaluate the total flavonoid content (using the aluminum chloride method), antioxidant capacity (Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS, and FRAP assays), and the profile of volatile organic compounds (via solid-phase microextraction) in *P. niruri* infusions prepared from reference and commercial samples. The results showed that flavonoids appear to have a substantial influence on the antioxidant potential of *P. niruri* infusions, particularly those derived from reference samples. Infusions made from the leaves of reference samples stood out in terms of antioxidant potential, especially as measured by the FRAP assay. This study presents novel data on the volatile compound profile of *P. niruri* infusions. A total of thirty-seven volatile organic compounds were identified across all analyzed infusions, with esters (14 compounds), hydrocarbons (6), and oxygenated terpenes (6) being the most prominent groups.

Keywords: *Phyllanthus niruri*, antioxidant capacity, volatile fraction.

1. INTRODUÇÃO

As ervas representam um recurso importante para o combate a diversas doenças, principalmente em países em desenvolvimento. Cerca de 60-90% dos habitantes de países não industrializados dependem da medicina tradicional para o tratamento de doenças comuns [1]. A atenção dada às

plantas biologicamente ativas também está associada ao seu baixo custo em comparação com os fármacos sintéticos [2]. No Brasil, 10% da flora é objeto de pesquisas, o que indica que há um grande potencial para descoberta de novas plantas com propriedades medicinais diante da enorme biodiversidade do país [3].

A espécie *Phyllanthus niruri* L., cujo nome popular é “quebra-pedra”, pertencente ao gênero *Phyllanthus* e à família Euforbiácea [4]. A “quebra-pedra” é uma planta herbácea, anual, que atinge até 0,5 metro de altura, ramificada, ramos globosos (desprovidos de pelos), folha com limbo (parte larga e plana das folhas) e flores pequenas, amarelas ou esverdeadas dispostas nas partes inferiores dos ramos [5]. Essa espécie tem sido estudada durante décadas com relação às suas propriedades medicinais [4].

Estudos clínicos realizados com *P. niruri* demonstraram a eficácia dessa planta no tratamento do cálculo renal, o que justifica o seu nome “quebra-pedra”. O extrato aquoso (infusão) de caules, folhas e raízes de *Phyllanthus niruri* têm alcaloides com efeito antiespasmódico e relaxante em muitos tecidos, como na musculatura lisa da uretra, contribuindo para a eliminação de cálculos menores [6]. Esse efeito antiespasmódico também é capaz de relaxar a musculatura lisa intestinal, diminuindo cólicas [7]. Além disso, os compostos triterpênicos presentes em fitoterápicos derivados dessa planta são capazes de reduzir a deposição dos cristais na urina [6]. A planta também possui propriedades anti-inflamatórias, auxiliando no tratamento da dor comum aos pacientes com cálculos renais [7].

Os flavonoides (quercetina e rutina), ácidos fenólicos (ácido gálico e ácido elágico), taninos e lignanas presentes na *P. niruri* têm atividade antioxidante, sendo capazes de exercer importante função na prevenção de distúrbios cardiovasculares, como aterosclerose, retardar o envelhecimento, o desenvolvimento de alguns cânceres, catarata e disfunções cognitivas [8].

A quercetina é capaz de eliminar radicais livres e possui ação quelante de íons, desempenhando importante papel na prevenção da oxidação da lipoproteína LDL, diminuindo assim a aterosclerose e a inflamação [9]. A rutina presente na *P. niruri* também pode minimizar os processos inflamatórios, reduzindo assim a incidência de doença cardíaca coronariana [10]. Os ácidos gálico e elágico, encontrados em grandes quantidades na *P. niruri*, possuem atividade antioxidante e habilidades quimiopreventivas para certos tipos de câncer [9]. O estudo *in vitro* de Júnior e colaboradores (2012) [11] mostrou que o extrato aquoso da *P. niruri*, junto com o medicamento cisplatina, tinha efeito contra células tumorais hepáticas e colorretais, o que diminuiria o volume do medicamento sintético utilizado no tratamento oncológico. Os componentes da *P. niruri* associados a esse efeito foram o ácido gálico, os flavonoides e os taninos, abundantes nessa erva.

O estudo de Sudarno e colaboradores (2011) [12] mostrou que os flavonoides presentes na *P. niruri* têm potencial antiviral e, segundo estudo de Murugesan e colaboradores (2021) [13], é possível verificar que compostos bioativos da *P. niruri* podem atuar como potenciais inibidores de proteases para o combate à COVID-19. A inibição de certas proteases pode interromper o processamento de proteínas virais, o que impede que o vírus se replique e infecte novas células.

Alguns estudos mostram a segurança toxicológica do uso da *P. niruri*, exceto para as gestantes. Barros e colaboradores (2005) [14] orientam em seu estudo a não fazer uso da *P. niruri* durante a gravidez, já que há risco de aborto em humanos. O estudo de Amin e colaboradores (2012) [15], que monitorou a toxicidade do extrato etanólico de *P. niruri* em ratos, nas dosagens de 2g/kg e 5g/kg de peso corporal, mostrou que não houve grandes alterações nas enzimas hepáticas e nem sinais clínicos de toxicidade nos ratos, indicando boa segurança quanto ao uso desse tipo de extrato.

Frente a todo esse potencial fitoterápico da *P. niruri* para o tratamento das diversas patologias descritas anteriormente, o estudo das infusões produzidas a partir de amostras dessa planta mostra-se relevante, visto que essas bebidas são a principal forma utilizada pela população brasileira para acessar a bioatividade da mesma. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o teor total de flavonoides, a capacidade antioxidante e o perfil de compostos voláteis de infusões de *P. niruri* produzidas a partir de amostras oriundas da cidade do Rio de Janeiro. Adicionalmente, infusões obtidas de partes distintas (raiz, folhas e caule) de amostras de *P. niruri* coletadas na natureza e identificadas botanicamente foram analisadas, com a finalidade de servirem como referencial da espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras

As amostras de “quebra-pedra” *in natura* foram obtidas no herbário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e localizadas por georreferencia com auxílio de GPS (localização 8°01'08.5"S; 34°56'44.3"O). Uma parte dessas amostras foi utilizada para a confecção de exsiccatas que foram depositadas no herbário da Fiocruz de Petrópolis (RJ); número do tombo RFFP 21956. A caracterização botânica da espécie foi feita na UFRJ por especialistas da área. O restante das amostras foi separado em raiz, folhas e caule; essas frações foram secas a 45°C em estufa com circulação forçada de ar (MARCONI - modelo 0314M272, Brasil) por 4 dias das 7h às 18h e, em seguida, foram moídas (as folhas em moedor manual da marca Guzzo (Brasil), enquanto os talos e raízes em moinho de rotor tipo ciclone da marca Tecnal, modelo TE-651/2, Brasil). Já as amostras comerciais de “quebra-pedra” (condicionadas em pequenos baldes de plástico, em sacos plásticos ou em embalagens tipo *Zip Lock*) foram obtidas em diferentes locais de venda do município do Rio de Janeiro (lojas de produtos naturais ou de produtos de academia) ou através da *internet*. Das cinco principais marcas comerciais disponíveis nesses locais, foram adquiridos três lotes distintos em quantidade suficiente para garantir a realização de todas as análises propostas abaixo.

2.2 Avaliação do teor de umidade das amostras de “quebra-pedra” comerciais e de referência

Para a avaliação do teor de umidade das amostras comerciais e de referência utilizou-se uma balança de infravermelho da marca GEHACA, modelo IV 2000, Brasil. As amostras de referência (folhas, caules e raízes) foram analisadas em triplicata. As amostras provenientes de cada um dos lotes de cada marca também foram analisadas em triplicata. Durante as análises foram utilizados 5 g de cada amostra.

2.3 Preparação das infusões de “quebra-pedra”

Cada extrato aquoso foi preparado pela infusão de 1,0 g de erva em 0,050 L de H₂O destilada fervente com agitação durante 10 minutos. Após resfriamento sob água corrente à temperatura ambiente, cada extrato foi transferido por filtração para balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi ajustado com o mesmo solvente (H₂O destilada) para obtenção de um extrato com concentração de 1% (m/v). Esse extrato mãe foi diluído sempre que necessário para a obtenção de novos extratos que viabilizassem os experimentos subsequentes [16]. Para a microextração em fase sólida e para o estabelecimento do teor total de flavonoides, as infusões foram preparadas adicionando-se 75 mL de água destilada fervente em 5 g de amostra, com agitação manual por dez minutos. Na sequência, o recipiente sofreu resfriamento sob água corrente à temperatura ambiente e o extrato sofreu filtração a vácuo, sendo posteriormente transferido para balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi ajustado com água destilada para obtenção de uma concentração final de 5% (m/v) = 50.000 µg/mL [17].

2.4 Determinação do teor total de flavonoides das infusões

A determinação do teor total de flavonoides (TTFla) das infusões foi realizada pelo emprego do método espectrofotométrico (equipamento EDUTEC EEQ-9023, Brasil) do cloreto de alumínio [18]. A rutina foi utilizada como composto de referência. As infusões de *P. niruri* a 5% foram utilizadas nesta análise. O TTFla foi calculado com base em uma curva padrão de rutina (20, 60, 100, 150, 200, 300, 600 e 1200 mg L⁻¹) e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de rutina por litro de infusão (mg ER L⁻¹) ou em mg de equivalentes de rutina por g de amostra seca (mg ER g⁻¹). A absorbância foi monitorada no comprimento de onda de 510 nm ($\lambda = 510$ nm).

2.5 Determinação da atividade antioxidante das infusões

2.5.1 Determinação do poder redutor total das infusões

O poder redutor total (PRT) das infusões foi determinado em espectrofotômetro (EDUTEQ EEQ-9023, Brasil) pelo emprego do reagente de Folin-Ciocalteu [19]. O ácido gálico foi utilizado como composto referência. As infusões a 1,0% (m/v) sofreram diluição para 0,2% (m/v); as infusões diluídas foram utilizadas nesta análise. O PRT das infusões foi calculado a partir de uma curva de calibração de ácido gálico (1, 5, 10, 25, 50, 100, 300, 600 e 1000 mg L⁻¹) e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por litro de infusão (mg EAG L⁻¹) ou em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra seca (mg EAG g⁻¹). A absorvância foi monitorada em $\lambda = 760$ nm.

2.5.2 Experimento com 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

O potencial antioxidante das infusões foi determinado espectrofotometricamente (equipamento EDUTEQ EEQ-9023, Brasil) pelo emprego do reagente DPPH [20]. As infusões foram diluídas em água destilada nas seguintes concentrações: 100, 400, 500, 700, 1000, 1200, 1300, 1500, 1700, 1800, 2000, 2300 e 2600 µg/mL. A CI₅₀ (concentração da infusão em µg/mL capaz de reduzir em 50% o conteúdo de radicais DPPH•) foi estimada por regressão linear. As absorvâncias foram monitoradas em $\lambda = 515$ nm. Para fins de comparação, determinou-se também a CI₅₀ dos antioxidantes ácido gálico e rutina.

2.5.3 Ensaio com o reagente 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS)

O potencial antioxidante das infusões também foi determinado espectrofotometricamente (equipamento EDUTEQ EEQ-9023, Brasil) pelo emprego do reagente ABTS [21]. As infusões foram diluídas em água destilada (25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 700 e 1000 µg/mL) e usadas na produção da curva (regressão linear) que viabilizou a determinação da CI₅₀ (concentração da infusão capaz de reduzir em 50% o conteúdo de radicais ABTS). As absorvâncias foram monitoradas em $\lambda = 750$ nm. O Trolox foi utilizado como controle positivo.

2.5.4 Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

O potencial antioxidante das infusões ainda foi avaliado espectrofotometricamente (equipamento EDUTEQ EEQ-9023, Brasil) pelo método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) [22]. As absorvâncias foram monitoradas em $\lambda = 595$ nm. As infusões a 1,0% (m/v) sofreram diluições e as infusões diluídas (1000, 1500 e 2500 mg/L) foram utilizadas nesta análise. A curva padrão foi feita com soluções de sulfato ferroso (500, 1.000, 1.500 e 2.000 mg/L) e os resultados foram expressos em µM FeSO₄/g de amostra seca.

2.6 Avaliação da fração volátil das infusões

2.6.1 Isolamento dos compostos voláteis por microextração em fase sólida

A fração volátil das infusões foi avaliada de acordo com o método proposto por Jung e colaboradores (2022) [17], com pequenas modificações. Para essas análises foram utilizadas as infusões preparadas na concentração de 5% (m/v), conforme item 2.3. Para o isolamento dos compostos orgânicos voláteis presentes nos *headspaces* das infusões recém preparadas, volumes de 10 mL das mesmas foram transferidos para frascos de vidro de 100 mL tampados com septo de PTFE/silicone, contendo uma pequena barra magnética para agitação. Os frascos foram mantidos a 60 °C por 60 minutos sob constante agitação, com uma fibra revestida de 100 µm de dimetilpolisiloxano (100% PDMS; Supelco, EUA) exposta ao *headspace* com o auxílio de um *holder* manual (Supelco, EUA) inserido através do septo. Antes da exposição da fibra ao *headspace*, seu pré-condicionamento foi feito a 250°C por 30 minutos no injetor do cromatógrafo

usado nas análises. Posteriormente, a dessorção dos compostos orgânicos voláteis foi feita a 250°C por 5 minutos no injetor do sistema de cromatografia gasosa, antes do início das corridas cromatográficas.

2.6.2 Identificação e quantificação dos Compostos orgânicos voláteis presentes nos headspaces das infusões

Para a quantificação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) presentes nos *headspaces* das infusões utilizou-se um cromatógrafo a gás com detector de ionização em chamas (CG/DIC) (GC-2010Plus, Shimadzu, Japão). A separação dos COVs foi feita em uma coluna (30 m x 0,25 mm d.i.) de dimetilpolisiloxano (0,25 µm de espessura) (SPB-1, Supelco, EUA). O forno cromatográfico foi programado para trabalhar de 60°C a 240°C, com a temperatura aumentando 3°C a cada minuto e permanecendo 15 minutos na temperatura máxima. O injetor trabalhou a 250°C e o detector a 260°C, sendo hélio o gás de arraste (1,0 mL/minuto). As injeções ocorreram em *splitless*. Os índices de retenção linear (IRL) foram estabelecidos pelo método de Kovats modificado [23], usando-se alcanos saturados (C₉-C₂₆ - 1.000 µg de cada hidrocarboneto/mL de hexano, Supelco, EUA). As concentrações dos COVs presentes nos *headspaces* das infusões foram estimadas através do método de padronização externa, com os padrões passando pelos mesmos processos de isolamento e análise que foram empregados para a avaliação da composição das infusões. Para identificação dos COVs, utilizou-se um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG/EM, GC-2010Plus/GCMS-QP2010, Shimadzu, Japão). As condições de análise foram similares às condições empregadas durante o trabalho de quantificação com o CG/DIC. Uma voltagem de ionização de 70 eV foi empregada no EM (módulo SCAN - 30 a 400 m/z - ciclos de 0,3 s). A fonte de íons e a interface com o CG permaneceram a 260°C. A identificação dos COVs foi baseada na análise de seus espectros de massas, com o auxílio das bibliotecas espectrais NIST12.lib e NIST62.lib, na avaliação de seus IRL e na coeluição com compostos padrões.

2.7 Avaliação estatística dos dados

As análises estatísticas foram executadas no Graph Pad Prism 6.0. Os valores obtidos para os parâmetros investigados foram submetidos à análise de variância unidirecional (One-Way ANOVA), seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey, visando identificar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$). As correlações entre os parâmetros avaliados foram estabelecidas pela aplicação do teste de Pearson, com o intuito de quantificar a magnitude e a direção das associações observadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Quantidade de amostra disponível nas embalagens usadas para o acondicionamento das ervas comerciais

A massa de amostra contida em cada uma das embalagens acondicionadoras da erva comercial foi determinada com o auxílio de uma balança de precisão (AD3300, Marte, BRASIL). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1. As marcas P [massa de amostra = $(34,66 \pm 1,95)$ g], E [$(18,19 \pm 0,64)$ g] e NU [$(31,49 \pm 0,60)$ g] apresentaram massa real um pouco maior do que a informada. A marca CC ($59,07 \pm 4,17$ g) apresentou um valor médio de massa ligeiramente menor do que o informado; foi a marca que apresentou o maior desvio padrão da média. A marca N ($19,06 \pm 0,52$ g) também apresentou um valor médio de massa numericamente menor do que o informado.

Tabela 1: Tipo de embalagem, massa informada e massa real.

Tipo de embalagem	Marca	Massa informada (g)	Massa real (g) (M $\pm$ DP)
Balde de plástico	CC	60g	59,07 $\pm$ 4,17
Embalagem plástica <i>Zip lock</i>	P	30g	34,66 $\pm$ 1,95
Embalagem plástica	N	20g	19,06 $\pm$ 0,52
Embalagem plástica	E	15g	18,19 $\pm$ 0,64
Embalagem plástica	NU	30g	31,49 $\pm$ 0,60

M = valor médio; DP = desvio padrão; CC – amostras comerciais da marca 1; P – amostras comerciais da marca 2; N – amostras comerciais da marca 3; E – amostras comerciais da marca 4; NU – amostras comerciais da marca 5.

3.2 Avaliação da presença de corpos estranhos

Alguns contaminantes foram encontrados eventualmente em algumas das amostras comerciais de *P. niruri* estudadas (Figura 1). Em uma das amostras do lote 1 da marca CC (CC1) foi detectado um contaminante com aspecto de semente com cerca de 1 cm de diâmetro. Em uma amostra NU2 o contaminante detectado tinha aparência de folha de capim limão. Na marca N foi encontrado um contaminante com aspecto de fragmento de tijolo em uma das amostras do lote 2 e um contaminante que parecia um caroço de milho em outra amostra desse mesmo lote. Por último, em uma das amostras do lote 1 da marca N foi encontrado um contaminante com aspecto de fruta seca.



Figura 1: Contaminantes encontrados nas ervas comerciais.

De acordo com a portaria nº 519, de 26 de junho de 1998, da Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS) [24], os contaminantes descritos anteriormente podem ser classificados como amidos estranhos (semente com diâmetro de aproximadamente 0,1 dm, caroço de milho), elementos histológicos estranhos (folha de capim-limão) e sujidades pesadas (fragmento de tijolo). A presença de contaminante com aspecto de fruta seca pode indicar a presença de amidos estranhos ou de fragmentos de outra planta não autorizada (elementos histológicos estranhos).

A portaria nº 519/1998 [24] estabelece o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de “chás” (plantas destinadas à preparação de infusões ou decocções). Esta portaria visa assegurar que os chás comercializados no Brasil sigam padrões de identidade e qualidade a fim de garantir a saúde de seus consumidores. Essa portaria estabelece, por exemplo, os parâmetros para avaliação microscópica de chás, visando identificar a presença de materiais estranhos e impurezas. Os limites estabelecidos para os contaminantes descritos anteriormente são: ausência em 5g de amostra para elementos histológicos estranhos e amidos estranhos e máximo de 150 mg por 10 g de amostra para sujidades pesadas. Apesar desses contaminantes terem sido identificados em algumas das amostras estudadas, a avaliação quantitativa, por exemplo, por quantidade de amostra monitorada, não foi desenvolvida. Dessa forma, não é

possível aferir se as amostras em questão estão ou não em conformidade com os padrões estabelecidos. De qualquer forma, a detecção de tais contaminantes em algumas das amostras indica que esse tipo de avaliação é importante e deve ser incentivada em futuros estudos. Contaminantes como a folha com aspecto de capim limão, se não retirados antes do preparo das infusões, podem, por exemplo, interferir no sabor, aroma e até mesmo no potencial bioativo das bebidas.

3.3 Teores de umidade das amostras de *P. niruri*

Os teores de umidade das amostras de *P. niruri* comerciais e de referência (caules, folhas e raízes) são apresentados na Tabela 2. Nas amostras comerciais os teores de umidade variaram de $[(9,13 \pm 0,80)\%$ - marca N] a $[(10,03 \pm 0,76)\%$ - marca E], não havendo diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre as marcas com relação a esse parâmetro.

Tabela 2: Teor de umidade das ervas comerciais e de referência.

Amostras	Teor de umidade (%) (M $\pm$ DP)
CC	$9,87 \pm 0,68^{a,b,c}$
P	$9,37 \pm 0,15^{a,b,c}$
N	$9,13 \pm 0,80^{a,b,c}$
E	$10,03 \pm 0,76^{a,b}$
NU	$9,67 \pm 0,85^{a,b}$
RF	$10,60 \pm 0,06^a$
RC	$8,20 \pm 0,25^c$
RR	$8,60 \pm 0,21^{b,c}$

CC – amostras comerciais da marca 1; P – amostras comerciais da marca 2; N – amostras comerciais da marca 3; E – amostras comerciais da marca 4; NU – amostras comerciais da marca 5; RF – amostras de referência constituídas por folhas de *P. niruri*; RC - amostras de referência constituídas por caules (talos) de *P. niruri*; RR – amostras de referência constituídas por raízes de *P. niruri*. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre os resultados ($p < 0,05$).

Já nas amostras de referência, os teores de umidade variaram de $[(8,20 \pm 0,25)\%$ (caules de referência – RC)] a $[(10,60 \pm 0,06)\%$ (folhas de referência – RF)]. Nesse caso, as amostras RC e RR (raízes de referência) não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) com relação a esse parâmetro. Entretanto, ambas (RC e RR) apresentaram teores de umidade inferiores ($p < 0,05$) ao apresentado pelas amostras RF. Um estudo desenvolvido em 2013 por Couto e colaboradores [25] avaliou as partes aéreas de *P. niruri* (folhas e talos) em função das condições de cultivo e colheita. Os resultados indicaram que, mesmo quando submetidas ao mesmo protocolo de secagem, as folhas apresentaram um teor de umidade residual superior ao dos talos, sugerindo que as propriedades anatômicas e higroscópicas das partes aéreas, especialmente das folhas, influenciam na retenção de água. Embora este estudo não tenha incluído as raízes na análise, é razoável inferir que as raízes apresentam características anatômicas e fisiológicas distintas, o que pode resultar em diferenças nos teores de umidade. As folhas possuem uma estrutura anatômica adaptada à fotossíntese e à transpiração, com estômatos e uma cutícula que regulam a perda de água. Já os talos e raízes têm funções estruturais e de transporte de água e nutrientes, com características anatômicas adaptadas a essas funções. Essas diferenças estruturais influenciam a capacidade de retenção de água de cada parte da planta [25, 26]. As amostras de RC também apresentaram um valor médio de umidade estatisticamente inferior ($p < 0,05$) aos observados nas amostras comerciais das marcas E e NU (Figura 2).

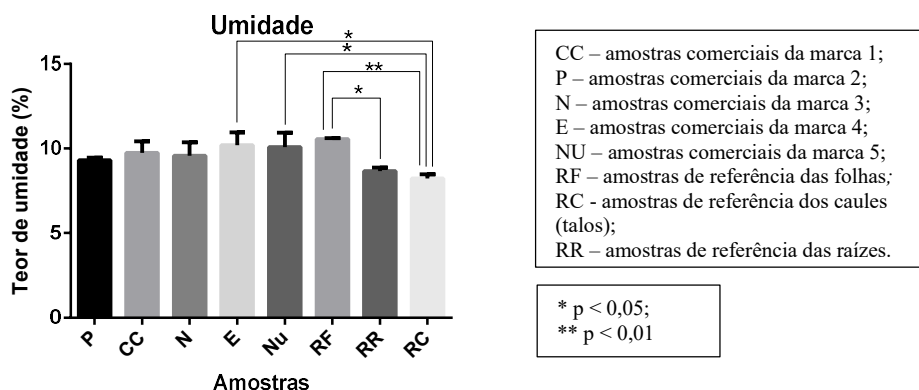


Figura 2: Teores de umidade (%) das amostras comerciais e de referência após processamento.

É importante destacar que os teores de umidade que estão sendo apresentados não estão associados às amostras de referência *in natura* recém coletadas, mas sim a essas amostras de referência após processamento (secagem e moagem), para que fossem avaliadas em uma condição mais similar a das amostras comerciais; a secagem desse tipo de amostra costuma ser uma estratégia comum e frequente para, por exemplo, aumentar o tempo de prateleira desse tipo de produto, com a redução da atividade de água.

As amostras comerciais estavam secas e fragmentadas, mas não havia descrição, por exemplo nos rótulos das embalagens, de como esses processos haviam sido conduzidos. Portanto, as condições de secagem e fracionamento das amostras comerciais provavelmente não foram exatamente iguais às condições empregadas no processamento das amostras de referência. De qualquer forma, todas as amostras apresentaram teores de umidade inferiores à faixa de 10 a 12%, normalmente associada a amostras comerciais de plantas destinadas à preparação de infusões ou decocções (chás), de acordo com a portaria nº 519, de 26 de junho de 1998, da Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS) [24].

As amostras comerciais pareciam conter uma mistura de folhas e caules (talos) da erva “quebra-pedra” em proporções variáveis, porém sempre com a presença de mais folhas do que talos. A umidade média das amostras comerciais foi de $(9,61 \pm 0,37) \%$, valor numericamente muito próximo ao encontrado para a média aritmética simples entre os teores de umidade de RF e RC (9,40%).

3.4 TTFla, PRT, $CI_{50(DPPH)}$, $CI_{50(ABTS)}$ e FRAP das infusões

Os valores médios para o teor total de flavonoides (TTFla), e o potencial antioxidante (expresso como poder redutor total (PRT), $CI_{50(DPPH)}$, $CI_{50(ABTS)}$ e como poder de redução de íons Fe^{3+} (FRAP)) das infusões de *P. niruri* (originárias das amostras comerciais ou de referência) são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Dosagem do teor total flavonoides, poder redutor total e capacidade antioxidante ($CI_{50(DPPH)}$, $CI_{50(ABTS)}$ e FRAP) das infusões de “quebra-pedra” produzidas a partir das amostras comerciais e de referência.

Amostras	TTFla (mg ER/g) (M ± DP)	PRT (mg EAG/g) (M ± DP)	$CI_{50(DPPH)}$ (µg/mL) (M ± DP)	$CI_{50(ABTS)}$ (µg/mL) (M ± DP)	FRAP (µM de Fe ²⁺ /g) (M ± DP)
CC	11,07 ± 2,09 ^{a,b}	19,13 ± 11,10 ^a	1604,15 ± 643,34 ^{a,b}	536,99 ± 299,13 ^a	243,67 ± 185,54 ^a
P	18,06 ± 8,63 ^a	27,12 ± 23,74 ^a	1173,6 ± 1083,39 ^{a,b}	283,68 ± 124,75 ^a	364,86 ± 319,84 ^a
N	11,80 ± 7,39 ^{a,b}	27,98 ± 23,61 ^a	2556,28 ± 1554,54 ^a	787,61 ± 738,61 ^a	257,85 ± 197,5 ^a
E	11,79 ± 4,14 ^{a,b}	40,28 ± 27,97 ^a	1577,78 ± 186,75 ^{a,b}	421,80 ± 118,42 ^a	303,13 ± 290,47 ^a
NU	18,32 ± 3,98 ^a	59,25 ± 14,90 ^a	603,09 ± 676,71 ^{a,b}	175,40 ± 88,18 ^a	768,49 ± 179,05 ^a
RF	17,68 ± 0,93 ^a	54,98 ± 4,53 ^a	164,65 ± 20,70 ^b	51,55 ± 4,10 ^a	1780,74 ± 244,17 ^b
RC	2,84 ± 0,13 ^b	17,32 ± 1,88 ^a	525,17 ± 50,76 ^{a,b}	370,16 ± 189,17 ^a	398,81 ± 108,76 ^a
RR	2,57 ± 0,52 ^b	13,90 ± 2,66 ^a	1253,63 ± 334,24 ^{a,b}	524,16 ± 263,68 ^a	238,003 ± 75,98 ^a

CC – amostras comerciais da marca 1; P – amostras comerciais da marca 2; N – amostras comerciais da marca 3; E – amostras comerciais da marca 4; NU – amostras comerciais da marca 5; RF – amostras de referência constituídas por folhas de *P. niruri*; RC – amostras de referência constituídas por caules (talos) de *P. niruri*; RR – amostras de referência constituídas por raízes de *P. niruri*; TTFla – teor total de flavonoides; PRT – poder redutor total; CI_{50} (concentração da infusão capaz de neutralizar 50% dos radicais DPPH ou ABTS). FRAP- poder antioxidante redutor de íons Fe³⁺; ER – equivalentes de rutina, EAG – equivalentes de ácido gálico; Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre os resultados ($p < 0,05$).

3.4.1 TTFla das infusões

As infusões das diferentes amostras de “quebra-pedra” comerciais não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) com relação ao TTFla. O TTFla médio dessas infusões variou de 11,07 (CC) a 18,32 (NU) mg ER/g de amostra seca (Tabela 3). O valor médio para esse parâmetro, considerando todas as amostras comerciais analisadas, foi de $(14,21 \pm 3,65)$ mg de ER/g de amostra seca. Dessa forma, em média, o conteúdo total de flavonoides das infusões das amostras de *P. niruri* comerciais mostrou-se semelhante ao conteúdo total $[(14,78 \pm 7,64)$ mg de ER/g de amostra seca] de flavonoides das infusões de *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca), produzidas a partir de amostras de referência e comerciais originárias do estado do Rio de Janeiro. Essa outra erva (pata-de-vaca) apresentou um TTFla variando de 4,82 – 37,00 mg ER/g de amostra seca [17]. As infusões de *P. niruri* também apresentaram um TTFla médio $[(710,70 \pm 182,59)$ mg de ER/L de infusão] próximo ao encontrado em infusões de boldo-do-chile comercializadas no Brasil $[(755,92 \pm 34,48)$ mg de ER/L de infusão] [20]. Por outro lado, o TTFla médio das infusões de *P. niruri* mostrou-se numericamente superior ao observado para as infusões da carqueja conhecida como *Baccharis myrioccephala* $[(11,58 \pm 1,25)$ mg de ER/g de amostra seca] [27]. Por conta dos desvios padrões associados a esses valores médios, é bem provável que essa diferença não seja estatisticamente significativa.

Com relação às amostras de referência, percebe-se que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre os TTFla das infusões produzidas a partir das amostras RR e RC. Por outro lado, o TTFla das infusões de RF mostrou-se superior ($p < 0,05$) aos teores encontrados para esses compostos fenólicos nas outras duas amostras de referência (RR e RC). As amostras de RF não diferiram das amostras comerciais com relação a esse parâmetro (medido em suas infusões). Já as amostras RR e RC apresentaram TTFla inferiores ($p < 0,05$) aos das amostras comerciais NU e P (Figura 3).

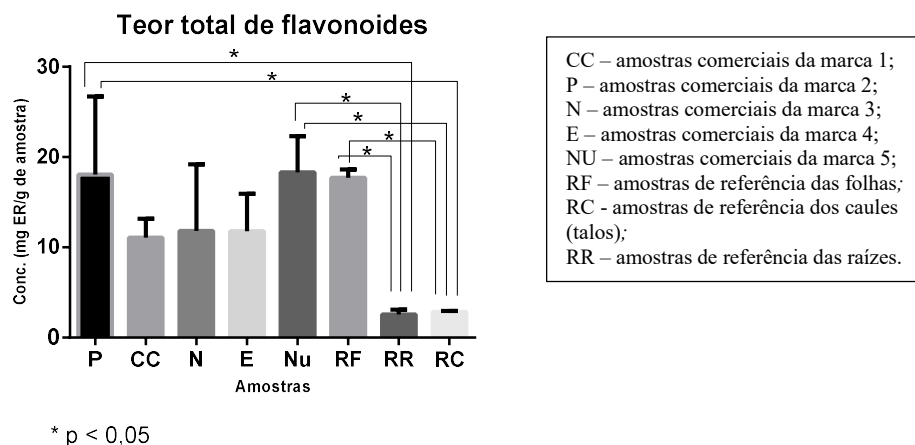


Figura 3: TTFla das infusões de *Phyllanthus niruri* L.

O TTFla de infusões de amostras de *P. niruri* já foi indicado em estudos anteriores [28, 29]. Entretanto, a comparação desses dados da literatura com os dados do presente estudo não é possível, por exemplo, pelo fato dos resultados terem sido apresentados em mg de equivalentes de quercetina (EQ)/g de peso seco [28]. No caso do estudo de Luliana e colaboradores (2019) [29], os resultados foram expressos por grama de extrato (fração aquosa: $20,07 \pm 1,23$ mg ER/g extrato), o que também inviabiliza a comparação com os dados obtidos no presente estudo, mesmo que a rutina tenha sido escolhida como composto de referência.

3.4.2 PRT das infusões

Com relação à capacidade antioxidante das infusões de “quebra-pedra” analisadas, um dos métodos empregados em seu monitoramento foi o de Folin-Ciocalteu. Esse método é frequentemente utilizado para a determinação do teor total de compostos fenólicos de diferentes matrizes. Entretanto, é importante destacar que o teste de Folin-Ciocalteu mede na realidade o poder redutor total das amostras. Dessa forma, associar os resultados deste teste exclusivamente à presença de compostos fenólicos é um equívoco. Isso pode produzir resultados superestimados para a concentração desse grupo, visto que outras substâncias com potencial redutor (p. ex.: açúcares redutores, vitamina C, carotenoides) podem contribuir positivamente com o teste. Sendo assim, o teste foi considerado como mais uma forma de avaliarmos a capacidade antioxidante das infusões de “quebra-pedra” testadas.

O PRT de extratos em clorofórmio das folhas de *P. niruri* foi estimado pelo método de Folin-Ciocalteu em 115,32 mg de EAG/g de amostra seca [30]. Esse valor é muito superior ao apresentado pelas infusões produzidas a partir das amostras de *P. niruri* comerciais ou de referência analisadas no presente estudo. Isso indica uma diferença importante entre o clorofórmio e a água fervente com relação às suas capacidades de extração dos compostos responsáveis pelo poder redutor desses dois tipos de extratos. Entretanto, devemos destacar que só as infusões podem ser consumidas pela população.

Navarro e colaboradores (2017) [31] também avaliaram o PRT de extratos de *P. niruri* ricos em polifenóis que foram produzidos com o auxílio de diferentes solventes (metil terc-butil éter, metanol, hexano e clorofórmio) e técnicas de ultrassom e rota-evaporação. Nesse estudo, o PRT foi estimado em $(328,80 \pm 13,41)$ mg de EAG/g de extrato. O processo de extração usado por Navarro e colaboradores (2017) [31] é muito diferente do processo de infusão; além disso, envolveu técnicas de concentração do extrato como, por exemplo, a rota-evaporação e os resultados foram expressos em relação à massa do extrato. Dessa forma, a comparação com os valores de PRT das infusões do presente estudo fica inviabilizada.

As infusões oriundas das amostras estudadas (comerciais e de referência) não diferiram ($p > 0,05$) com relação aos valores de PRT. O PRT médio, considerando todas as amostras de *P. niruri* analisadas, foi de $(32,50 \pm 17,26)$ mg de EAG/g de amostra seca. Esse valor se mostra

numericamente superior ao valor encontrado para o PRT das infusões de *Baccharis myriocephala* [(25,26 ± 1,72) mg EAG/g de amostra seca] [27], mas é possível que isso não reflita uma diferença estatisticamente significativa. Por outro lado, as infusões de “quebra-pedra” apresentaram um PRT [(65,66 ± 34,93) mg de EAG/L de infusão] inferior ao observado para as infusões produzidas a partir de amostras comerciais de boldo-do-chile [(806,10 ± 201,81) mg de EAG/L de infusão] [20].

Os valores médios de PRT das infusões de “quebra-pedra” provenientes das amostras comerciais NU e das amostras de referência das folhas (RF) mostraram-se bem próximos ao valor médio de PRT [(58,37 ± 8,61) mg EAG/g] encontrado para infusões comerciais de erva mate, planta de consumo muito popular no sul do Brasil [32].

3.4.3 $CI_{50(DPPH)}$, $CI_{50(ABTS)}$ e FRAP das infusões

Na revisão da literatura, realizada para o desenvolvimento do presente estudo, não foram identificados outros trabalhos de pesquisa que fizessem referência à capacidade antioxidante, medida pelo emprego dos reagentes DPPH, ABTS ou FRAP, de infusões de *P. niruri* preparadas de forma similar à indicada no presente estudo. Os extratos aquosos analisados nos estudos disponíveis na literatura foram preparados de maneira muito distinta, empregando, por exemplo, técnicas de concentração como a liofilização [2, 33]. Dessa forma, a comparação efetiva desses dados com os produzidos no presente estudo não se mostra possível.

A capacidade antioxidante (CA) das infusões de *P. niruri* testadas também foi expressa como $CI_{50(DPPH)}$ ou $CI_{50(ABTS)}$. Quanto menor é o CI_{50} de uma solução, maior será seu potencial antioxidante. A CA das infusões medida pelo ensaio com o reagente DPPH produziu valores de CI_{50} que variaram de (164,65 ± 20,70) µg/mL (RF) a (2556,28 ± 1554,54) µg/mL (N). Somente as infusões dessas duas amostras (RF e N), que apresentaram os valores extremos da faixa de $CI_{50(DPPH)}$, diferiram estatisticamente (Figura 4). Desconsiderando esses valores extremos, o valor médio de $CI_{50(DPPH)}$ das demais infusões é de (1122,90 ± 465,97) µg/mL. Esse valor é inferior ao valor de $CI_{50(DPPH)}$ [(2.210 ± 270) µg/mL] estimado para as infusões de *Baccharis myriocephala* [27]. Dessa forma, a maioria das infusões de “quebra-pedra” parece apresentar um potencial antioxidante (medido pelo emprego do reagente DPPH) superior ao das infusões dessa espécie de carqueja. Por outro lado, a maioria dessas infusões de “quebra-pedra” apresenta uma CA inferior à CA apresentada (430 µg/mL) pelas infusões de boldo-do-chile [20].

Os valores de $CI_{50(DPPH)}$ da rutina e do ácido gálico foram 93 µg/mL e 8,5 µg/mL [34]. Sendo assim, as infusões de *P. niruri* do presente estudo possuem um potencial antioxidante inferior ao observado para esses dois padrões de compostos antioxidantes.

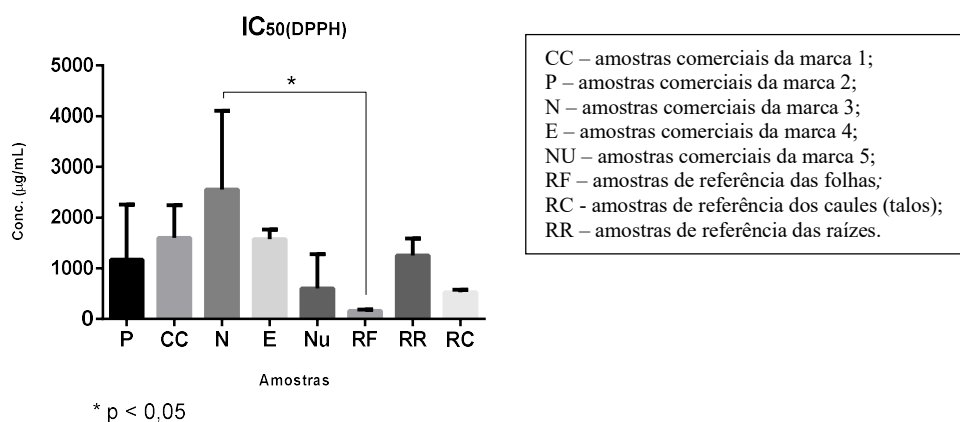


Figura 4: CA das infusões de *Phyllanthus niruri* L. expressa como $CI_{50(DPPH)}$.

A CA antioxidante das infusões de *P. niruri* também foi determinada pelo teste com o reagente ABTS. Nesse caso, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre as diferentes infusões analisadas. A CA média, considerando todas as amostras analisadas, foi representada pelo valor de $CI_{50(ABTS)}$ de $(393,92 \pm 230,18) \mu\text{g/mL}$. Esse resultado mostrou-se superior ao valor de $CI_{50(ABTS)}$ do Trolox (6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), que foi estimado em $28 \mu\text{g/mL}$ [35]. Dessa forma, as infusões de *P. niruri* apresentam um potencial antioxidante inferior ao do Trolox.

Por último, a CA de cada infusão foi testada pelo método de FRAP. Os valores associados à CA medida por esse método variaram de $(238,00 \pm 75,98) \mu\text{M de Fe}^{2+}/\text{g}$ de amostra seca (RR) a $(1780,74 \pm 244,17) \mu\text{M de Fe}^{2+}/\text{g}$ de amostra seca (RF). A CA das infusões produzidas a partir das folhas de referência (RF) mostrou-se estatisticamente superior ($p < 0,05$) às capacidades antioxidantes de todas as demais infusões avaliadas. Esse resultado reforçou as tendências numéricas observadas nos testes com DPPH e ABTS, que faziam as infusões de RF se destacarem, mas não a ponto de se diferenciarem de todas as demais de forma estatisticamente significativa. Provavelmente, isso não aconteceu em função dos elevados desvios padrões observados, principalmente para as infusões provenientes das amostras comerciais. Como a bioatividade dessas plantas está relacionada com substâncias produzidas pelo seu metabolismo secundário, variações de composição e bioatividade podem ser observadas de forma mais marcante entre amostras de diferentes lotes, visto que os padrões de síntese desses metabólitos secundários respondem a estímulos de fatores bióticos ou abióticos aos quais o vegetal esteja exposto [36-39].

3.4.4 Correlações entre os parâmetros medidos: TTFla, PRT, $CI_{50(DPPH)}$, $CI_{50(ABTS)}$ e FRAP das infusões

A avaliação dos dados com o auxílio do teste de Pearson reforçou a influência que os flavonoides parecem ter sobre o potencial antioxidante dessas infusões de *P. niruri*. Essa influência mostrou-se mais marcante durante a avaliação das amostras de referência (RF, RR e RC). Observou-se, por exemplo, um elevado coeficiente de correlação de Pearson positivo ($r = + 0,980485$, $p = 0,01304062$) entre os valores de TTFla e de PRT para essas infusões. De forma semelhante, foi possível observar um coeficiente de correlação de Pearson positivo de grandeza similar ($r = + 0,9813557$, $p = 0,0007898894$) pela comparação dos valores de TTFla com os valores associados à CA (medida por FRAP) das infusões originárias das amostras de referência. A comparação dos valores de TTFla com os valores de CA medidos pelos ensaios com DPPH ou ABTS geraram coeficientes de correlação (r) um pouco menores em módulo, mas ainda assim estatisticamente significativos para as amostras de referência. Comparando os dados de TTFla com os valores de $CI_{50(DPPH)}$ obteve-se um $r = - 0,7208868$ ($p = 0,01414661$). No caso da comparação dos valores de TTFla com os valores de $CI_{50(ABTS)}$, o coeficiente de correlação de Pearson foi de $- 0,7527099$ ($p = 0,01271333$). Isso indica que quanto maior é a concentração total de flavonoides da infusão, menor é seu valor de $CI_{50(DPPH)}$ ou de $CI_{50(ABTS)}$ e, portanto, maior é sua capacidade antioxidante.

Coefficientes de correlação de Pearson menores, mas ainda estatisticamente significativos, indicaram contribuição semelhante do TTFla sobre a CA das infusões originárias das amostras comerciais: TTFla x PRT ($r = + 0,6233242$, $p = 0,01304062$); TTFla x FRAP ($r = + 0,7697683$, $p = 0,0007898894$); TTFla x $CI_{50(DPPH)}$ ($r = - 0,6176444$, $p = 0,01414661$); TTFla x $CI_{50(ABTS)}$ ($r = - 0,6250764$, $p = 0,01271333$).

3.5 Fração volátil das infusões

Os compostos orgânicos voláteis presentes nas infusões originárias das amostras de *P. niruri* comerciais estão listados na Tabela 4, enquanto que os compostos orgânicos voláteis identificados nas infusões provenientes das amostras de referência são apresentados na Tabela 5.

Tabela 4: Compostos orgânicos voláteis presentes no headspace das infusões de *Phyllanthus niruri* L. produzidas a partir das amostras comerciais.

Compostos	IRL-C	IRL-L	CC (µg/mL)	P (µg/mL)	N (µg/mL)	E (µg/mL)	NU (µg/mL)
Espatulenol ^{SO}	1550	1572 ^N	ND	0,09±0,09	ND	ND	ND
2,2,4-Trimetil-1,3-pentanodiol diisobutirato ^{Est}	1577	1587,5 ^{PC}	0,72±0,07	3,00±0,96	2,30±1,27	1,51±0,67	1,63±0,88
Tributil fosfato ^{Est}	1618	1619 ^N	0,12±0,02	0,08±0,09	0,08±0,06	0,09±0,08	0,09±0,02
1-Tetradecanol ^{Alc}	1659	1659 ^N	0,03±0,01	ND	ND	0,02±0,02	ND
α-Pentilcinamaldeído ^{Ald}	1708	1672 ^N	0,33±0,02	0,18±0,07	0,17±0,14	0,28±0,06	0,32±0,08
Ácido tetradecanoico ^{AG}	1754	1752 ^N	0,15±0,14	0,04±0,04	0,02±0,04	0,18±0,09	0,11±0,11
2-Etil-hexil salicilato ^{Est}	1777	1769 ^N	0,66±0,44	0,45±0,46	0,47±0,43	1,31±1,78	0,28±0,15
Octadecano ^{Hid}	1798	1800 ^{Ph}	0,04±0,01	0,05±0,02	0,05±0,03	0,05±0,01	0,04±0,01
Isopropil miristato ^{Est}	1811	1812 ^N	0,04±0,02	0,03±0,02	0,01±0,01	ND	0,01±0,01
Ácido pentadecanoico ^{AG}	1848	1848 ^N	0,01±0,02	NI	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,02
Homossalato ^{Est}	1855	1903,8 ^{PC}	1,73±1,14	1,32±1,56	1,48±1,35	0,62±0,57	0,92±0,78
1-Hexadecanol ^{Alc}	1862	1862 ^N	0,25±0,10	0,16±0,22	0,24±0,21	4,12±6,41	0,31±0,33
Nonadecano ^{Hid}	1897	1900 ^{Ph}	ND	ND	0,01±0,02	ND	ND
Metil hexadecanoato ^{Est}	1908	1908 ^N	ND	0,02±0,02	0,07±0,07	ND	ND
Ácido n-hexadecanoico ^{AG}	1951	1951 ^N	1,58±0,33	0,39±0,68	0,26±0,35	0,72±0,85	0,20±0,35
Eicosano ^{Hid}	1997	2000 ^{Ph}	0,05±0,03	ND	0,03±0,03	0,05±0,02	ND
Isopropil palmitato ^{Est}	2008	2011 ^{PC}	0,01±0,02	ND	0,01±0,01	0,01±0,01	ND
Manool ^{DO}	2025	2055 ^{Ph}	0,11±0,04	0,12±0,09	0,07±0,07	0,08±0,07	0,10±0,09
1-Otadecanol ^{Alc}	2063	2063 ^N	0,08±0,13	0,04±0,06	0,08±0,08	0,60±0,55	0,29±0,45
Dodecil benzoato ^{Est}	2164	2163 ^{Ph}	ND	ND	0,01±0,02	ND	ND
Tributil acetilcitrato ^{Est}	2218	2224 ^N	ND	0,01±0,02	ND	ND	0,02±0,04

IRL-C – índice de retenção linear calculado [23]; IRL-L – índice de retenção linear da literatura (N – NIST; PC – PubChem; Ph – Pherobase); CC – amostras comerciais da marca 1; P – amostras comerciais da marca 2; N – amostras comerciais da marca 3; E – amostras comerciais da marca 4; NU – amostras comerciais da marca 5; ND – não detectado; Ald – Aldeído; Est – Éster; SO – Sesquiterpeno oxigenado; AG – Ácido graxo; Hid – Hidrocarboneto; Alc – Álcool; DO – diterpeno oxigenado.

3.5.1 Perfil geral dos headspaces

Considerando todas as infusões analisadas, foram identificados trinta e sete (37) compostos orgânicos voláteis. Esses compostos podem ser divididos em terpênicos (6) e não terpênicos (31). No grupo dos compostos terpênicos foram encontrados dois monoterpenos oxigenados, três sesquiterpenos oxigenados e um diterpeno oxigenado. Já no grupo dos compostos não terpênicos foram encontradas as seguintes classes químicas: ésteres (14 representantes), hidrocarbonetos (6), ácidos graxos (4), álcoois (4) e aldeídos (3). Nove desses compostos foram encontrados em todas as infusões (comerciais ou de referência): 2,2,4-trimetil-1,3-pentanodiol diisobutirato, tributil fosfato, α-pentilcinamaldeído, ácido tetradecanoico, 2-etil-hexil salicilato, octadecano, homossalato, 1-hexadecanol e ácido n-hexadecanoico. Desse grupo, os compostos orgânicos voláteis majoritários foram o 2,2,4-trimetil-1,3-pentanodiol diisobutirato [concentração variando de (0,72 ± 0,07) µg/mL (CC) a (3,29 ± 1,00) µg/mL (RR)], o homossalato [(0,42 ± 0,26) µg/mL (RF) a (1,73 ± 1,14) µg/mL (CC)], o 2-etil-hexil salicilato [(0,22 ± 0,03) µg/mL (RC) a (1,31 ± 1,78) µg/mL (E)], o ácido n-hexadecanoico [(0,20 ± 0,35) µg/mL (NU) a (1,58 ± 0,33) µg/mL (CC)] e o α-pentilcinamaldeído [(0,17 ± 0,14) µg/mL (N) a (0,33 ± 0,02) µg/mL (CC)]. Apesar das diferenças numéricas entre esses valores de concentração, a avaliação estatística mostrou que as amostras não diferiram de forma significativa ($p > 0,05$) com relação a esse parâmetro. A presença desses nove compostos orgânicos voláteis e de alguns outros, comuns a várias das amostras comerciais e de referência (por exemplo: isopropil miristato, ácido pentadecanoico, eicosano, isopropil palmitato e manool), sugere razoável semelhança entre esses dois grupos (amostras comerciais e de referência), o que pode indicar um potencial uso desse perfil de compostos voláteis das infusões (obtido pela técnica de microextração em fase sólida) para avaliação da autenticidade das amostras comerciais dessa erva.

Tabela 5: Compostos orgânicos voláteis presentes no headspace das infusões de *Phyllanthus niruri* L. produzidas a partir das amostras de referência.

Compostos	IRL-C	IRL-L	RF (µg/mL)	RC (µg/mL)	RR (µg/mL)
β-Linalol ^{MO}	1079	1079 ^N	0,04±0,02	ND	ND
Decanal ^{Ald}	1179	1179 ^N	ND	ND	0,01±0,02
3-Hidróxi-2,4,4-trimetilpentil-2-metilpropanoato ^{Est}	1347	1365,2 ^N	ND	ND	0,01±0,01
cis-Geranilacetona ^{MO}	1425	1425 ^{PC}	0,03±0,02	0,02±0,00	0,06±0,09
Ácido dodecanoico ^{AG}	1554	1554 ^N	0,04±0,06	0,01±0,01	NI
2,2,4-Trimetil-1,3-pentanodiol diisobutirato ^{Est}	1577	1587,5 ^{PC}	2,19±1,81	3,06±1,05	3,29±1,00
Globulol ^{SO}	1598	1598 ^N	ND	ND	0,09±0,08
Hexadecano ^{Hid}	1598	1600 ^{Ph}	0,10±0,16	0,03±0,04	ND
Tributil fosfato ^{Est}	1618	1619 ^N	0,17±0,04	0,14±0,02	0,13±0,03
1-Tetradecanol ^{Alc}	1659	1659 ^N	0,03±0,05	0,02±0,03	ND
Etil-hexil benzoato ^{Est}	1679	1674 ^{PC}	0,02±0,02	ND	ND
Pentadecanal ^{Ald}	1691	1690 ^N	0,01±0,01	ND	ND
Heptadecano ^{Hid}	1698	1700 ^{Ph}	0,05±0,06	0,04±0,04	0,03±0,01
α-Pentilcinamaldeído ^{Ald}	1708	1672 ^N	0,24±0,04	0,18±0,03	0,20±0,01
Ácido tetradecanoico ^{AG}	1754	1752 ^N	0,33±0,30	0,13±0,22	0,08±0,06
2-Etil-hexil salicilato ^{Est}	1777	1769 ^N	0,19±0,10	0,22±0,03	0,25±0,13
1-Octadeceno ^{Hid}	1788	1788 ^N	0,05±0,08	0,02±0,04	ND
1-Pentadecanol ^{Alc}	1794	1794 ^N	0,02±0,03	ND	ND
Octadecano ^{Hid}	1798	1800 ^{Ph}	0,13±0,17	0,11±0,13	0,06±0,04
Isopropil miristato ^{Est}	1811	1812 ^N	0,07±0,10	0,06±0,07	ND
Ácido pentadecanoico ^{AG}	1848	1848 ^N	0,07±0,08	0,04±0,07	0,01±0,02
Homossalato ^{Est}	1855	1903,8 ^{PC}	0,42±0,26	0,55±0,14	0,45±0,42
1-Hexadecanol ^{Alc}	1862	1862 ^N	0,08±0,05	0,11±0,05	0,09±0,05
Farnesil acetona ^{SO}	1887	1886 ^{PC}	0,03±0,01	ND	ND
Nonadecano ^{Hid}	1897	1900 ^{Ph}	0,04±0,04	0,04±0,06	0,01±0,01
Metil hexadecanoato ^{Est}	1908	1908 ^N	0,46±0,64	0,28±0,42	0,07±0,12
Ácido n-hexadecanoico ^{AG}	1951	1951 ^N	1,37±0,54	0,41±0,45	0,57±0,43
Eicosano ^{Hid}	1997	2000 ^{Ph}	0,03±0,03	0,03±0,03	ND
Isopropil palmitato ^{Est}	2008	2011 ^{PC}	0,02±0,01	0,01±0,02	ND
Manool ^{DO}	2025	2055 ^{Ph}	0,16±0,07	0,10±0,01	ND
Metil trans-9-octadecenoato (metil elaidato) ^{Est}	2078	2082 ^{PC}	0,52±0,80	0,38±0,65	0,067±0,10
Metil éster do ácido oleico ^{Est}	2082	2082 ^N	ND	0,01±0,02	ND
Metil estearato ^{Est}	2107	2107 ^N	0,03±0,03	0,02±0,03	ND
Tributil acetilcitrato ^{Est}	2218	2224 ^N	0,01±0,02	0,01±0,02	ND

IRL-C – índice de retenção linear calculado [23]; IRL-L – índice de retenção linear da literatura (N – NIST; PC – PubChem; Ph – Pherobase); RF – amostras de referência constituídas por folhas de *P. niruri*; RC – amostras de referência constituídas por caules (talos) de *P. niruri*; RR – amostras de referência constituídas por raízes de *P. niruri*; ND – não detectado; MO – Monoterpeno oxigenado; Ald – Aldeído; Est – Éster; SO – Sesquiterpeno oxigenado; AG – Ácido graxo; Hid – Hidrocarboneto; Alc – Álcool; DO – diterpeno oxigenado.

3.5.2 Compostos orgânicos voláteis de destaque

Desse grupo de compostos voláteis comuns as várias das amostras comerciais e de referência, destacam-se o diterpeno oxigenado manool e o ácido pentadecanoico. O manool só não foi detectado nas infusões provenientes das raízes de referência (RR). Na *Salvia officinalis* esse diterpeno oxigenado se destaca no aspecto quantitativo. Esse COV é capaz de induzir o relaxamento vascular da aorta de ratos (modulação da via NO/GMPc). Além disso, ele promove a redução da pressão arterial aumentando a produção/biodisponibilidade de óxido nítrico no plasma. Essas ações podem explicar o efeito anti-hipertensivo do manool [40]. O ácido pentadecanoico só não foi encontrado nas infusões provenientes das amostras comerciais da marca P. Esse ácido graxo já foi associado às seguintes propriedades bioativas: antioxidante, hipocolesterolêmica, nematocida, pesticida, anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica [41].

O composto orgânico volátil 1-octadecanol só foi encontrado nas infusões provenientes das amostras comerciais; porém, ele foi encontrado nas amostras das cinco diferentes marcas analisadas (Tabela 4). Por outro lado, o β -linalol, o etil-hexil benzoato, o pentadecanal, o 1-pentadecanol e a farnesil acetona só foram detectados nas infusões produzidas a partir das folhas das amostras de referência (RF) (Tabela 5). O β -Linalol apresenta limiar odorífero em H₂O de 6 μ g/L [20], sendo muito comumente classificado como um composto de odor ativo em várias plantas. Esse composto orgânico volátil possui aroma doce e agradável, lembrando frutas frescas, mamão e capim; possui propriedades anti-inflamatória, anti-hiperalgésica, antinociceptiva, acaricida, bactericida e fungicida [20, 42, 43]. O oleato de metila só foi encontrado nas infusões dos caules de referência (RC), enquanto que os compostos voláteis decanal, 3-hidróxi-2,4,4-trimetilpentil-2-metilpropanoato e o globulol foram identificados somente nas infusões originárias das amostras de referência das raízes de *P. niruri* (RR).

Alguns compostos orgânicos voláteis (cis-geranilacetona, heptadecano, metil elaidato) foram encontrados em todas as amostras de referência (RF, RC e RR), mas estavam ausentes das amostras comerciais. A cis-geranilacetona possui um limiar de odor em água de 60 μ g/L e seu odor já foi relacionado com notas de verde e de magnolia [44]. Esse composto volátil, associado a uma nota odorífera floral, parece ter um impacto significativo no aroma de frutas como uvas, maçãs, lichia e mangas [17]. Jung e colaboradores (2022) [17] detectaram esse composto orgânico na fração volátil de todas as infusões de *Bauhinia forficata* L (comerciais ou de referência) avaliadas pelo emprego de técnicas analíticas semelhantes às técnicas utilizadas no presente estudo.

3.5.3 Justificativas para as diferenças observadas

As diferenças de perfil descritas acima e outras pequenas diferenças observadas podem ser explicadas por vários fatores. A composição dessas frações voláteis sofre grande influência das condições do ambiente onde a planta se desenvolve. A disponibilidade hídrica, a salinidade do solo, as condições climáticas, o período de colheita e a herbivoria, por exemplo, podem interferir no metabolismo secundário da planta, provocando variações nos perfis dessas frações voláteis. Alguns desses compostos voláteis, provenientes do metabolismo secundário da planta, exercem funções ecológicas e fisiológicas importantes como, por exemplo, ação atratora de polinizadores, participação em estratégias de proteção contra a herbivoria, formação de pigmentos fotossintéticos e ação hormonal [36, 37, 39].

As condições de processamento e armazenamento dessas plantas também podem influenciar o perfil químico de suas infusões. Por exemplo, a temperatura e o tempo de secagem das plantas podem favorecer perdas diferenciais por volatilização e seu grau de fragmentação pode afetar o rendimento de extração durante a infusão, influenciando a composição química final desses produtos [45, 46].

Por último, é importante destacar que a composição da fração volátil das infusões de ervas é influenciada pela parte da planta utilizada (folhas, caules, raízes e flores), refletindo funções ecológicas específicas e características bioquímicas de cada órgão vegetal. Portanto, ao preparar infusões, também é importante considerar a parte da planta escolhida, pois isso determinará em

parte o perfil de compostos voláteis e, consequentemente, o aroma, sabor e as potenciais propriedades terapêuticas dessas infusões [25, 26].

4. CONCLUSÃO

Esse estudo destaca-se por oferecer informações sobre o TTFla e a CA (PRT, $CI_{50(DPPH)}$, $CI_{50(ABTS)}$ e FRAP) de infusões de *P. niruri* preparadas em condições similares às condições normalmente utilizadas para a preparação de infusões caseiras. Dessa forma, os resultados apresentados indicam os teores totais de flavonoides e os potenciais antioxidantes que costumam ser efetivamente acessados pelos consumidores dessa erva através da principal forma utilizada em seu consumo: a infusão. Os flavonoides parecem ter expressiva influência sobre o potencial antioxidante dessas infusões de *P. niruri*, principalmente nas amostras de referência.

O estudo também apresenta o primeiro conjunto de dados sobre o perfil de compostos orgânicos voláteis das infusões de *P. niruri*, com destaque para aqueles compostos que têm potencial para estarem associados com a primeira impressão odorífera relacionada a esse tipo de infusão, visto que foram isolados do *headspace* dessas bebidas. A presença de vários compostos em comum entre as frações voláteis das infusões originárias das amostras de referência e comerciais sugere que as amostras comerciais são autênticas, ou seja, pertencem à espécie *Phyllanthus niruri*.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Sr. Sérgio Salvia Monteiro e a toda sua equipe pelo auxílio com a aquisição da erva *P. niruri in natura*. Agradeço à CAPES, ao CNPq e à FAPERJ pelo apoio financeiro durante a pesquisa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Liheluka E, Gibore NS, Lusingu JPA, Gesase S, Minja DTR, Lamshoft M, et al. Community perceptions on the effectiveness of herbal medicines and factors associated with their use in managing diarrhoea among under-five children in North-eastern Tanzania. *Trop Med Health*. 2023;51:48. doi: 10.1186/s41182-023-00537-5
2. Amin Z, Abdulla M, Alshawsh M, Qadir S. Assessment of In vitro antioxidant, antibacterial and immune activation potentials of aqueous and ethanol extracts of *Phyllanthus niruri*. *J Sci Food Agric*. 2012;92(9):1874-7. doi: 10.1002/jsfa.5554
3. Bernstein N, Akram M, Daniyal M, Koltai H, Fridlender M, Gorelick J. Antiinflammatory potential of medicinal plants: a source for therapeutic secondary metabolites. *Adv Agron*. 2018;150:131-84. doi: 10.1016/bs.agron.2018.02.003
4. Marques L. *Phyllanthus niruri* (Quebra-Pedra) no tratamento de urolitíase: proposta de documentação para registro simplificado como fitoterápico. *Rev Fitos*. 2010;5(3):20-33.
5. Bezerra W, Silva M, Bezerra A, Bezerra K, Vieira A, Pereira D, et al. O uso de fitoterapia com ação anti-inflamatória que atuam no sistema geniturinário. *Rev gvaa*. 2014;8(1):24-36.
6. Boim M, Heilberg I, Schor N. *Phyllanthus niruri* as a promising alternative treatment for nephrolithiasis. *Int Braz J Urol*. 2010;36(6):657-64. doi: 10.1590/S1677-55382010000600002
7. Rosario A, Almeida S. Análise fitoquímica da espécie *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra). *Est Cient (UNIFAP)*. 2016;6(1):35-41. doi: 10.18468/estcien.2016v6n1.p35-41
8. Mehta M, Gupta S, Duseja A, Goyal S. Phytochemical and antioxidants profiling of *Phyllanthus niruri*: a hepatoprotective plant. *World J Pharm Pharm Sci*. 2019;8(8):1117-27. doi: 10.20959/wjpps20198-14392
9. Rusmana D, Wahyudianingsih R, Elisabeth M, Balqis M, Widowati W. Antioxidant Activity of *Phyllanthus niruri* Extract, Rutin and Quercetin. *Indones Biomed J*. 2017;9(2):84-90. doi: 10.18585/inabj.v9i2.281
10. Zielińska D, Szawara-Nowak D, Zieliński H. Determination of the antioxidant activity of rutin and its contribution to the antioxidant capacity of diversified buckwheat origin material by updated analytical strategies. *Polish J Food Nutr Sci*. 2010;60:315-21.

11. Júnior RFA, Soares LAL, Porto CRC, Aquino RGF, Guedes HG, Petrovick PR, et al. Growth inhibitory effects of *Phyllanthus niruri* extracts in combination with cisplatin on cancer cell lines. *World J Gastroenterol.* 2012;18(31):4162-8. doi: 10.3748/wjg.v18.i31.4162
12. Sudarno S, Setiorini F, Suprpto H. Efektifitas ekstrak tanaman meniran (*Phyllanthus niruri*) sebagai antibakteri edwardsiella tarda secara *in vitro*. *J Ilm Perikan dan Kelaut.* 2011;3(1):103-8. doi: 10.20473/jipk.v3i1.11631
13. Murugesan S, Kottekad S, Crasta I, Sreevathsan S, Usharani D, Perumal M, et al. Targeting COVID-19 (SARS-CoV-2) main protease through active phytochemicals of ayurvedic medicinal plants – *Emblica officinalis* (Amla), *Phyllanthus niruri* Linn. (Bhumi Amla) and *Tinospora cordifolia* (Giloy) – a molecular docking and simulation study. *Comp Biol Med.* 2021;136:1-13. doi: 10.1016/j.combiomed.2021.104683
14. Barros F, Albuquerque I. Substâncias e medicamentos abortivos utilizados por adolescentes em unidade secundária de saúde. *Rev Bras Promoç Saúde.* 2005;8(4):177-84. doi: https://doi.org/10.5020/941
15. Amin ZA, Bilgen M, Alshawsh MA, Ali HM, Hadi AHA, Abdulla MA. Protective role of *Phyllanthus niruri* extract against thioacetamide-induced liver cirrhosis in rat model. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:241583. doi: 10.1155/2012/241583
16. Abi-Zaid IE, Riachi LG, De Maria CAB, Moreira RFA. Investigation of the volatile fraction of chamomile (*Matricaria recutita* L.) infusions prepared from Brazilian commercial sachets. *Int Food Res J.* 2015;22(5):2133-40.
17. Jung EP, de Freitas BP, Kunigami CN, Moreira DL, de Figueiredo NG, Ribeiro LO, et al. *Bauhinia forticata* Link infusions: chemical and bioactivity of volatile and non-volatile fractions molecules. *Molecules.* 2022;27(17):5415. doi: 10.3390/molecules27175415
18. Neves LC, de Alencar SM, Carpes ST. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. *Braz J Food Technol.* 2009;7:107-10.
19. Govindarajan R, Rastogi S, Vijaykumar M, Shirwaikar A, Rawat AKS, Mehrotra S, et al. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biol Pharm Bull.* 2003;26(10):1424-7. doi: 10.1248/bpb.26.1424
20. Souza WFM, Mariano XM, Isnard JL, de Souza GS, Gomes ALS, Carvalho RJT, et al. Evaluation of the volatile composition, toxicological and antioxidant potentials of the essential oils and teas of commercial Chilean boldo samples. *Food Res Int.* 2019;124:27-33. doi: 10.1016/j.foodres.2018.12.059
21. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Pérez-Jiménez J, et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺. Fortaleza (CE): Embrapa Agroindústria Tropical; 2007. (Comunicado Técnico on line, 128).
22. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Pérez-Jiménez J, et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza (CE): Embrapa Agroindústria Tropical; 2006. (Comunicado Técnico on line, 125).
23. Van Den Dool H, Kratz D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr.* 1963;11:463-7. doi: 10.1016/S0021-9673(01)80947-X
24. Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998. Dispõe sobre o controle sanitário de água potável. Brasília (DF): Diário Oficial da União; 30 jun 1998.
25. Couto AG, Kunzler ML, Spaniol B, Magalhães PM, Ortega GG, Petrovick PR. Chemical and technological evaluation of the *Phyllanthus niruri* aerial parts as a function of cultivation and harvesting conditions. *Rev Bras Farmacogn.* 2013;23(1):36-43. doi: 10.1590/S0102-695X2013005000002
26. Alade GO, Oladipo OT, Frank A, Ajibesin KK. Quality control of medicinal plants: establishing some pharmacopoeial standards for the leaf of *Phyllanthus niruri* L. *Niger J Nat Prod Med.* 2020;24(1):1-6.
27. Teixeira IEA-Z, Rocha CB, Heiden G, Moreira RFA. Evaluation of the essential oil and tea produced from *Baccharis myriocephala* leaves. *J Essent Oil Res.* 2024;36:1-7. doi: 10.1080/10412905.2024.2371827
28. Nguang SL, Yeong YL, Pang SF, Gimbun J. Ultrasonic assisted extraction on phenolic and flavonoid content from *Phyllanthus niruri* plant. *Indian J Sci Technol.* 2017;10(2):1-5. doi: 10.17485/ijst/2017/v10i2/110391
29. Luliana S, Desnita R, Martien R, Nurrochmad A. Total flavonoid contents and *in silico* study of flavonoid compounds from Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) towards alpha-amylase and alpha-glucosidase enzyme. *Pharmaciana.* 2019;9(1):1-10. doi: 10.12928/pharmaciana.v%vi%i.10416
30. Kumar SR, Chozhan K, Muruges K. Determination of bioactive compounds in the leaf extract of *Phyllanthus niruri*, *Emblica officinalis* and *Psoralea corylifolia*. *J Ayurvedic Herb Med.* 2022;8(1):11-3. doi: 10.31254/jahm.2022.8104

31. Navarro M, Moreira I, Arnaez E, Quesada S, Azofeifa G, Alvarado D, et al. Proanthocyanidin characterization, antioxidant and cytotoxic activities of three plants commonly used in traditional medicine in Costa Rica: *Petiveria alliacea* L., *Phyllanthus niruri* L. and *Senna reticulata* Willd. *Plants* (Basel). 2017;6(4):E50. doi: 10.3390/plants6040050
32. Souza S, Setiorini F, Suprpto H. Efektifitas ekstrak tanaman meniran (*Phyllanthus niruri*) sebagai antibakteri *edwardsiella tarda* secara *in vitro*. *J Ilm Perikan dan Kelaut*. 2011;3(1):103-8. doi: 10.20473/jipk.v3i1.11631
33. Harish R, Shivanandappa T. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. *Food Chem*. 2006;95(2):180-5. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.11.049
34. Oliveira DA, Rocha CB, Moreira RFA. Evaluation of the essential oils and teas produced from the Bahia and Pará cocoa almond husks. *Sci Plena*. 2023;19(1):011502. doi: 10.14808/sci.plena.2023.011502
35. Marques TS, Moreira RFA, Ayres EMM. Characterization of the essential oils from leaves of different sweet potato cultivars grown in Brazil. *S Afr J Bot*. 2022;144:18-22. doi: 10.1016/j.sajb.2021.09.005
36. Heldt HW, Piechulla B. *Plant Biochemistry*. 4. ed. Amsterdam: Elsevier; 2011.
37. Zhou W, Kügler A, McGale E, Haverkamp A, Knaden M, Guo H, et al. Tissue-Specific emission of (E)- α -bergamotene helps resolve the dilemma when pollinators are also herbivores. *Curr Biol*. 2017;27(9):1336-41. doi: 10.1016/j.cub.2017.03.017
38. Sharma A, Shahzad B, Rehman A, Bhardwaj R, Landi M, Zheng B. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*. 2019;24(13):2452. doi: 10.3390/molecules24132452
39. Li J, Hu H, Chen Y, Xie J, Li J, Zeng T, et al. Tissue specificity of (E)- β -farnesene and germacrene D accumulation in pyrethrum flowers. *Phytochem*. 2021;187:112768. doi: 10.1016/j.phytochem.2021.112768
40. Monteiro ASN, Campos DR, Albuquerque AAS, Evora PRB, Ferreira LG, Celotto AC. Efeito do diterpeno manool sobre a pressão arterial e reatividade vascular em ratos normotensos e hipertensos. *Arq Bras Cardiol*. 2020;115(4):669-77. doi: 10.36660/abc.20190198
41. Pasaribu T, Sinurat A, Wina E, Cahyaningsih T. Evaluation of the phytochemical content, antimicrobial and antioxidant activity of *Cocos nucifera* liquid smoke, *Garcinia mangostana* pericarp, *Syzygium aromaticum* leaf, and *Phyllanthus niruri* L. extracts. *Vet World*. 2021;14(11):3048-55. doi: 10.14202/vetworld.2021.3048-3055
42. Araujo MC, Pinheiro MCO, Teixeira IEA-Z, Riachi LG, Rocha CB, De Maria CAB, et al. Volatile and semi-volatile composition of the ripe Brazilian couroupita guianensis fruit. *The Nat Prod J*. 2014;4(4):280-9. doi: 10.2174/2210315505666141215215931
43. Mariano XM, Souza WFM, Rocha CB, Moreira RFA. Bioactive volatile fraction of Chilean boldo (*Peumus boldus* Molina) – an overview. *J Essent Oil Res*. 2019;31(6):474-86. doi: 10.1080/10412905.2019.1617797
44. Zhu W, Fang X, Wang W, Xu W, Chen W, Wu S, et al. Aroma effects of critical volatile compounds during thermophilic bacteria pile-fermentation in dark tea using gas chromatography mass spectrometry and odor activity value. *Food Sci. Technol*. 2022;42:e87022. doi: 10.1590/fst.87022
45. Aziz ZAA, Ahmad A, Setapar SHM, Karakucuk A, Azim MM, Lokhat D, et al. Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential - a review. *Curr Drug Metab*. 2018;19(13):1100-10. doi: 10.2174/1389200219666180723144850
46. Krakowska-Sieprawska A, Kielbasa A, Rafińska K, Ligor M, Buszewski B. Modern methods of pre-treatment of plant material for the extraction of bioactive compounds. *Molecules*. 2022;27(3):730. doi: 10.3390/molecules27030730