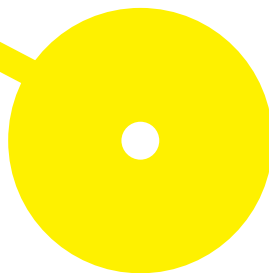




Quantificação de compostos fenólicos nas plantas *Euphorbia paralias* e *Euphorbia hirsuta*

Liliana Isabel Silva Queirós Moreira

11/2022





Quantificação de compostos fenólicos nas plantas *Euphorbia paralias* e *Euphorbia hirsuta*

Autor

Liliana Isabel Silva Queirós Moreira

Orientadores

Prof. Doutora Patrícia Carla dos Santos Correia, Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto (IPP)

Prof. Doutora Cláudia Marta Libreiro de Pinho, Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto (IPP)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmácia – Ramo de Especialização em Tecnologia do Medicamento e de Produtos de Saúde pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

"An expert is a man who has made all the mistakes, which can be made, in a narrow field."

Niels Bohr

Agradecimentos

A realização deste projeto e a elaboração da presente dissertação representou um grande desafio pessoal.

Em primeiro lugar, um agradecimento especial à minha família, pois eles são e serão sempre o início, o meio e o fim de cada momento da minha vida.

Em segundo, não posso deixar de agradecer à Professora Doutora Patrícia Correia e Professora Doutora Cláudia Pinho pela orientação desta tese, pelos ensinamentos transmitidos, e pela simpatia e constante disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas, sem esquecer a motivação nos momentos em que os problemas pareciam maiores do que as soluções. O constante apoio e motivação foram a garantia da realização deste trabalho.

À Professora Doutora Luísa Barreiros pela disponibilidade e pelo esclarecimento de dúvidas relacionadas com a validação do método.

À aluna de Doutoramento Dra. Mariana Leitão pela boa disposição, pela disponibilidade em colaborar e pelos conhecimentos transmitidos durante o desenvolvimento do método e análise cromatográfica.

Ao colega de Curso e de Laboratório, Dr. Pedro Cruz, pelo espírito de entreajuda, disponibilidade e incentivo constante para levar esta dissertação a bom Porto.

Aos amigos e colegas de trabalho, Cláudia A. Pinho, Pedro Galante, Ricardo Lopes, Sara Martins e Tânia Lourenço pela constante ajuda e pela preciosa revisão ortográfica e literária.

Por fim, agradeço a todos os colegas de trabalho do IPO Porto, que de uma ou de outra forma, contribuíram para que este Mestrado e, nomeadamente o desenvolvimento desta dissertação, se tornasse numa experiência extremamente enriquecedora e valiosa.

A todos eles, o meu sincero obrigado!

Resumo

As plantas apresentam fitoquímicos de elevado interesse, mas a composição de muitas espécies permanece por explorar, como as do género *Euphorbia*. O objetivo do estudo foi otimizar e revalidar um método analítico para quantificação de compostos fenólicos, por cromatografia líquida de elevada eficiência, aplicado a extratos de *Euphorbia paralias* e *Euphorbia hirsuta*. A análise realizou-se em fase reversa, com fase estacionária de octadecilsílica, e mistura de metanol, acetonitrilo e água acidificada com ácido acético, como fase móvel. O método foi otimizado para analisar ácido gálico, quercetina-3-glucósido e rutina. Avaliou-se a linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limites de deteção e quantificação. O método foi linear entre 0,37–47,61 µg/mL ($R > 0,999$), o coeficiente de variação < 15% e exatidão entre 93–113%. Os limites de quantificação foram: 0,23 µg/mL (ácido gálico), 2,98 µg/mL (quercetina-3-glucósido) e 0,44 µg/mL (rutina). Com base nestas e em calibrações de outros compostos, detetou-se: quercetina-3-glucósido (19980 µg/g), rutina, ácidos cafeico (460 µg/g), clorogénico (740 µg/g) e gálico (27440 µg/g) (extrato aquoso de *E. paralias*); hesperidina, quercetina-3-glucósido, rutina, ácidos clorogénico (880 µg/g) e gálico (5180 µg/g), (extrato aquoso de *E. hirsuta*). Estes resultados preliminares são pioneiros na quantificação de compostos fenólicos nestas plantas. Estudos futuros são necessários para a quantificação destes compostos.

Palavras-chave: Métodos analíticos, HPLC-DAD, Compostos Fenólicos, *Euphorbia paralias*, *Euphorbia hirsuta*

Abstract

Plants present phytochemicals of high interest, although the composition of many species remains unexplored, such the *Euphorbia* genus. The aim of the study was to optimize and revalidate an analytical method for phenolic compounds quantification, by High Performance Liquid Chromatography, applied to extracts of *Euphorbia paralias* and *Euphorbia hirsuta*. The analysis was performed in reverse phase, with a stationary phase of octadecylsilica, and a mixture of methanol, acetonitrile and water acidified with acetic acid, as the mobile phase. The method was optimized to analyze gallic acid, quercetin-3-glucoside and rutin. Linearity, sensitivity, precision, accuracy, detection and quantification limits were evaluated. The method was linear between 0.37–47.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($R > 0.999$), the coefficient of variation $< 15\%$ and accuracy between 93–113%. The quantification limits were 0.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (gallic acid), 2.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (quercetin-3-glucoside) and 0.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (rutin). Based on these and on calibrations of other compounds, it was detected: quercetin-3-glucoside (19980 $\mu\text{g}/\text{g}$), rutin, caffeic (460 $\mu\text{g}/\text{g}$), chlorogenic (740 $\mu\text{g}/\text{g}$) and gallic acids (27440 $\mu\text{g}/\text{g}$) (aqueous extract of *E. paralias*); hesperidin, quercetin-3-glucoside, rutin, chlorogenic (880 $\mu\text{g}/\text{g}$) and gallic (5180 $\mu\text{g}/\text{g}$) acids (aqueous extract of *E. hirsuta*). These preliminary results are pioneers in quantification of phenolic compounds in these plants. Future studies are needed for a quantification of these compounds.

Keywords: Analytical methods, HPLC-DAD, Phenolic Compounds, *Euphorbia paralias*, *Euphorbia hirsuta*

Índice

Agradecimentos	III
Resumo	IV
Abstract	V
Índice de abreviaturas, acrónimos e siglas	VIII
Índice de tabelas	X
Índice de figuras	XI
1. Introdução	1
1.1. Importância das plantas medicinais	1
1.2. Plantas medicinais e metabolitos secundários	2
1.2.1. Compostos fenólicos	2
1.3. Plantas do género <i>Euphorbia</i>	7
1.3.1. <i>Euphorbia paralias</i>	9
1.3.1.1. Características gerais	9
1.3.1.2. Composição química	10
1.3.1.3. Usos tradicionais e atividades biológicas	11
1.3.2. <i>Euphorbia hirsuta</i>	12
1.3.2.1. Características gerais	12
1.3.2.2. Composição química	13
1.3.2.3. Usos tradicionais e atividades biológicas	13
1.4. Métodos analíticos	13
1.4.1. Cromatografia	14
1.4.1.1. Cromatografia líquida de elevada eficiência	14
1.4.1.2. Métodos de quantificação de compostos fenólicos em <i>Euphorbia</i>	20
1.5. Validação de métodos analíticos	22
1.5.1. Seletividade/Especificidade	23
1.5.2. Linearidade	23
1.5.3. Precisão	24
1.5.3.1. Repetibilidade	24
1.5.3.2. Reprodutibilidade	25
1.5.3.3. Precisão Intermédia	25
1.5.4. Exatidão	25
1.5.5. Limites de deteção e quantificação	26

1.5.6.	Sensibilidade.....	27
1.5.7.	Robustez.....	27
2.	Objetivos.....	28
3.	Material e Métodos.....	29
3.1.	Material vegetal.....	29
3.2.	Preparação das amostras.....	29
3.3.	Padrões e reagentes.....	29
3.4.	Preparação de soluções <i>stock</i> e soluções padrão para a reta de calibração.....	30
3.5.	Identificação e quantificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD.....	31
3.6.	Análise estatística e validação do método.....	33
4.	Resultados e Discussão.....	34
4.1.	Otimização do método analítico.....	34
4.2.	Validação de método analítico.....	37
4.3.	Resultados das amostras de EM e EA de <i>E. paralias</i> e <i>E. hirsuta</i>	43
5.	Conclusão.....	47

Índice de abreviaturas, acrónimos e siglas

A	Área do pico cromatográfico
ACF	Ácido cafeico
ACL	Ácido clorogénico
ACN	Acetonitrilo
AG	Ácido gálico
AIM	Autorização de Introdução no Mercado
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
A549	Linhas celulares cancerígenas do pulmão
<i>b</i>	Ordenada na origem
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CAT	Catalase
CISA	Centro de Investigação em Saúde e Ambiente
CMI	Concentração mínima inibitória
CN	Cianopropilo
CV	Coefficiente de variação
C ₈	Octilo
C ₁₈	Octadecilo
C ₆ H ₅	Fenilo
CH ₂ O ₂	Ácido fórmico
DAD	<i>Diode array Detector</i> – Detetor de fotodíodos
EA	Extrato aquoso
EM	Extrato metanólico
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
GSH	Glutathione redutase
<i>h</i>	Altura do pico cromatográfico
<i>H</i>	Altura equivalente de prato teórico
HepG2	Linhas celulares cancerígenas hepáticas
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> – Cromatografia líquida de elevada eficiência
HESP	Hesperidina
H ₂ O	Água
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% das células
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
K	Constante de distribuição
K'	Fator de retenção ou fator de capacidade
LOD	<i>Limit of detection</i> – Limite de deteção
LOQ	<i>Limit of quantification</i> – Limite de quantificação

<i>m</i>	Declive da reta
MDA	Malondialdeído
MeOH	Metanol
MS	<i>Mass spectrometry</i> – Espectrometria de massa
<i>N</i>	Número de pratos teóricos
NARG	Naringina
NH ₂	Aminopropilo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFM	Padrão fenólico misto
PKC	Proteína cinase C
QUER3G	Quercetina-3-glucósido
<i>R</i>	Coeficiente de correlação
<i>R</i> ²	Coeficiente de determinação
RP	<i>Reverse phase</i> – Fase reversa
RMF	Resistência a múltiplos fármacos
RMN	Ressonância magnética nuclear
<i>Rs</i>	Resolução
RUT	Rutina
<i>s</i>	Desvio padrão absoluto
<i>s_b</i>	Desvio padrão da ordenada na origem
<i>s_m</i>	Desvio padrão do declive
SOD	Superóxido dismutase
SPI	Solução padrão individual
THP-1	Linha celular de leucemia mieloide aguda humana
<i>t_M</i>	Tempo morto
<i>t_R</i>	Tempo de retenção
UPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência, associada a espectrometria de massa e onda de ionização por <i>electrospray</i>
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
VIH-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
<i>x</i>	Concentração do analito
<i>y</i>	Resposta medida ou sinal
<i>W</i>	Largura do pico cromatográfico
α	Fator de separação ou seletividade

Índice de tabelas

Tabela I. Estrutura química das principais classes de flavonóides e compostos relacionados	6
Tabela II. Compilação de algumas metodologias para a determinação do perfil de compostos fenólicos em <i>Euphorbia</i> segundo vários autores	21
Tabela III. Compostos utilizados como padrões cromatográficos, com indicação de marca, CAS, estado de pureza, massa molecular e lote	30
Tabela IV. Preparação dos nove níveis de concentração das soluções de padrão fenólico misto	31
Tabela V. Gradiente de eluição da fase móvel utilizado no sistema cromatográfico para a análise dos compostos fenólicos	33
Tabela VI. Dados analíticos para o método de cromatografia líquida de elevada eficiência para os compostos fenólicos utilizados como padrão e seus respectivos comprimento de onda de detecção e tempo de retenção	37
Tabela VII. Dados analíticos para o método de cromatografia líquida de elevada eficiência para os compostos fenólicos utilizados como padrão e respectivas faixas de linearidade e critérios de linearidade tendo em conta o declive (m), o desvio padrão do declive (s_m), a ordenada na origem (b), o desvio padrão da ordenada na origem (s_b) e o coeficiente de correlação (R)	40
Tabela VIII: Valores de limite de detecção e limite de quantificação para os compostos ácido gálico, rutina e quercetina-3-glucósido	41
Tabela IX. Dados analíticos de precisão e exatidão para o método de cromatografia líquida de elevada eficiência para os compostos ácido gálico, rutina e quercetina-3-glucósido para os diferentes níveis de concentração	42
Tabela X. Caracterização de compostos fenólicos nos extratos de <i>E. paralias</i> e <i>E. hirsuta</i> por cromatografia líquida de elevada eficiência com detetor de fotodíodos	45

Índice de figuras

Figura 1. Estrutura química do ácido gálico	3
Figura 2. Estrutura química do ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico, ácido <i>o</i> -hidroxibenzóico, ácido vanílico e ácido siríngico	3
Figura 3. Estrutura química do ácido <i>p</i> -cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sináptico	4
Figura 4. Estrutura química de alguns ácidos fenólicos (ácido <i>p</i> -cumárico, ácido cafeico e ácido ferúlico), do ácido quínico e de um ácido clorogénico	4
Figura 5. Estruturas da cadeia 2-fenil-benzopirona, com sistema de anel-A benzoil e anel-B hidroxicinamoil	5
Figura 6. Espécie <i>Euphorbia paralias</i>	9
Figura 7. Distribuição em Portugal da espécie <i>Euphorbia paralias</i>	10
Figura 8. Espécie <i>Euphorbia hirsuta</i>	12
Figura 9. Distribuição em Portugal da espécie <i>Euphorbia hirsuta</i>	13
Figura 10. Componentes de um aparelho de cromatografia líquida de elevada eficiência	15
Figura 11. Representação esquemática de um cromatograma de separação de dois compostos e respetivos parâmetros cromatográficos	18
Figura 12. Parâmetros cromatográficos	19
Figura 13. Parâmetros de validação de um método analítico	22
Figura 14. Equipamento de cromatografia líquida de elevada eficiência com detector de fotódiodos do Centro de Investigação em Saúde e Ambiente marca <i>Jasco</i> [®]	32
Figura 15. Perfil cromatográfico obtido a 280 nm, 320 nm e 350 nm da solução de padrão fenólico misto e descrição dos respetivos tempos de retenção dos compostos	36
Figura 16. Retas de calibração do ácido gálico na gama de concentrações de 0,37 a 5,95 µg/mL e 2,98 a 47,61 µg/mL	38
Figura 17. Retas de calibração da rutina na gama de concentrações de 0,37 a 5,95 µg/mL e 2,98 a 47,61 µg/mL	39
Figura 18. Retas de calibração da quercetina-3-glucósido na gama de concentrações de 2,98 a 47,61 µg/mL	39
Figura 19. Perfil cromatográfico obtido a 320 nm para o extrato metanólico de <i>E. paralias</i> (1 mg extrato/mL) e identificação dos compostos fenólicos	43
Figura 20. Perfil cromatográfico obtido a 320 nm para o extrato aquoso de <i>E. paralias</i> (1 mg extrato/mL) e identificação dos compostos fenólicos	43
Figura 21. Perfil cromatográfico obtido a 280 nm para o extrato metanólico de <i>E. hirsuta</i> (1 mg extrato/mL) e identificação dos compostos fenólicos	44
Figura 22. Perfil cromatográfico obtido a 320 nm para o extrato aquoso de <i>E. hirsuta</i> (0,50 mg extrato/mL) e identificação dos compostos fenólicos	44

1. Introdução

O reino vegetal apresenta uma grande diversidade de compostos do metabolismo secundário com elevado interesse, nomeadamente, os compostos fenólicos (Al-Yousef *et al.*, 2021; Araújo *et al.*, 2014). As plantas são utilizadas desde a antiguidade para fins medicinais no tratamento de doenças e distúrbios que afetam o ser humano (Chaachouay *et al.*, 2019; Ghani *et al.*, 2020). A Farmacognosia, que consiste no estudo de produtos naturais e seus constituintes, desempenha um papel importante no desenvolvimento de novos medicamentos. De salientar, que para alguns países, os produtos à base de plantas continuam a ser os agentes terapêuticos mais disponíveis (Murray, 2020).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), no final da década de 1990, aproximadamente 80% da população mundial recorreu a plantas medicinais para as necessidades de saúde primárias, mas a sua utilização não se restringe somente aos países em desenvolvimento. Nos últimos 30 a 40 anos, houve um grande aumento na informação científica sobre plantas, extratos de plantas e várias substâncias ativas provenientes de plantas como agentes medicinais (Murray, 2020). No entanto, apesar do grande desenvolvimento na área da Fitoquímica e das cerca de 250.000 espécies de plantas superiores documentadas, o conhecimento da composição química de muitas espécies, permanece ainda por explorar, e apenas 5-10% dessas espécies foram investigadas até ao momento (Cunha *et al.*, 2014; Evans, 2002). Muitas espécies vegetais ainda não foram estudadas do ponto de vista químico ou farmacológico, sobretudo em países com menor investimento nesta área, tal como Portugal, embora exista uma grande diversidade de flora (Cunha *et al.*, 2014).

O conhecimento das plantas e o estudo do seu potencial biológico só podem ser realizados no contexto da investigação científica contínua. O desenvolvimento alcançado a nível das técnicas analíticas e da Farmacologia permitiram aos investigadores uma melhor compreensão das potencialidades de algumas plantas medicinais (Murray, 2020). No início do século XX, a Botânica preocupava-se com a descrição e identificação de plantas, assim como com a sua história, recolha, preparação e armazenamento (Evans, 2002). Recentemente, as melhorias das técnicas de cultivo de plantas e da qualidade dos extratos (através do controlo da qualidade e da padronização) permitiram o desenvolvimento de alguns medicamentos à base de plantas eficazes (Murray, 2020).

1.1. Importância das plantas medicinais

Em 2002, as estimativas do número de espécies de plantas com flores variavam entre 200.000 e 250.000, incluídas em cerca de 300 famílias e 10.500 géneros (Evans, 2002). Até 2006, mais de 20.000 plantas medicinais foram analisadas pela OMS, sendo que cerca de 250 espécies foram estudadas no sentido de identificar composto bioativos (Azaizeh *et al.*, 2006). Apesar do rápido desenvolvimento da literatura existente, muitas espécies com potenciais propriedades terapêuticas ainda não foram convenientemente estudadas sob o ponto de vista químico e farmacológico, no entanto,

continuam a ser utilizadas popularmente e com bons resultados (Cunha & Roque, 2014d; Evans, 2002). Neste sentido, estudos efetuados para a determinação da composição em metabolitos secundários e da sua análise farmacológica em muitas plantas de uso tradicional têm vindo a contribuir para o aumento do arsenal terapêutico disponível (Chaachouay *et al.*, 2019; Tanaka & Kashiwada, 2021).

O género ou a família botânica podem dar indicações sobre determinados tipos de compostos ativos, contudo, a identificação botânica da planta em análise deve ser confirmada taxonomicamente (Cunha & Roque, 2014e). Um grande número de plantas está constantemente a ser investigado quanto às suas potenciais propriedades farmacológicas (ex: propriedades anti-inflamatórias, hipoglicemiantes, hipotensivas, citotóxicas, antimicrobianas e no tratamento de parkinsonismo) (Evans, 2002). Sabe-se que, alguns fármacos antineoplásicos importantes foram descobertos a partir de plantas, como por exemplo, o paclitaxel, isolado em 1967 da casca do *Taxus brevifolia* (Janet *et al.*, 2017). Desta forma, vários investigadores têm continuado a analisar os extratos vegetais em relação à sua potencial atividade citotóxica (Ashraf, 2020; Merrouni & Elachouri, 2020).

Entre os extratos vegetais, os compostos fenólicos têm sido alvo de especial atenção e pesquisa por parte dos investigadores (Al-Yousef *et al.*, 2021; Albuquerque *et al.*, 2020). Por exemplo, os flavonóides e outros compostos fenólicos presentes em plantas medicinais têm demonstrado benefícios e aplicações para a saúde, bem como um amplo espectro de atividades, como anti-inflamatórias, antioxidantes, hepatoprotetoras, anticancerígenas e antimicrobianas (Ghani *et al.*, 2020).

As plantas do género *Euphorbia* apresentam um grande potencial como fonte de novos compostos bioativos, que pode levar ao desenvolvimento de potenciais medicamentos para uso terapêutico.

1.2. Plantas medicinais e metabolitos secundários

As plantas produzem inúmeros metabolitos secundários, como polifenóis e fenóis simples, que apresentam múltiplas estruturas, mas têm em comum um ou mais anéis aromáticos (Araújo *et al.*, 2014). Os compostos fenólicos são o grupo de metabolitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal e estão presentes em todos os órgãos das plantas (Alara *et al.*, 2021; Messaoudene *et al.*, 2018).

1.2.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos constituem um dos principais grupos de metabolitos secundários nas plantas, e têm recebido um particular interesse no âmbito da investigação (Al-Yousef *et al.*, 2021; Evans, 2002; Irakli *et al.*, 2012b). Estes compostos derivam essencialmente de duas vias anabólicas: a via do ácido chiquímico e/ou a via do acetato (Cunha & Roque, 2014b). Atualmente, estão identificadas mais de 8000 estruturas fenólicas (Messaoudene *et al.*, 2018). Os compostos fenólicos variam de estruturas simples com um anel aromático, a estruturas mais complexas, como os taninos e lignanos (Cunha &

Roque, 2014b; Evans, 2002). Os ácidos fenólicos e flavonóides são compostos fenólicos amplamente distribuídos nas plantas superiores (Hassan, 2022).

Quanto à sua utilização, os compostos fenólicos podem ser utilizados na indústria alimentar como corantes, aromatizantes e antioxidantes. Destacam-se pela sua atividade farmacológica os ácidos fenólicos, os taninos, as cumarinas, as quinonas, os flavonóides e os lignanos (Evans, 2002). Os benefícios dos compostos fenólicos têm vindo a ser comprovados através de vários estudos, que demonstram uma ampla gama de atividades biológicas como antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória, antimicrobiana, antimutagénica, antiulcerosa, antiaterosclerótica, antitrombogénica, antiviral, hepatoprotetora, antialérgica e propriedades citotóxicas (Al-Yousef *et al.*, 2021; Hassan, 2022; Kasmi *et al.*, 2021).

a. Fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados

Os fenóis simples são mais escassos nas plantas, à exceção dos derivados da hidroquinona, geralmente sob a forma de glucósido de um difenol (arbutina ou arbutósido) ou do seu monometiléter (metilarbutina). Por sua vez, os ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico são mais abundantes no reino vegetal, comparativamente aos fenóis simples, nomeadamente os compostos hidroxilados, alguns dos quais ligados a oses (Cunha *et al.*, 2010; Irakli *et al.*, 2012a). Os ácidos fenólicos hidroxilados, derivados do ácido benzóico, estão representados nos taninos hidrolisáveis, como o **ácido gálico (AG)** (Figura 1) e o ácido elágico (Cunha & Roque, 2014a). Outros exemplos de ácidos fenólicos com estrutura do tipo C₆-C₁, incluem o ácido *p*-hidroxibenzóico, o ácido *o*-hidroxibenzóico (ácido salicílico), o ácido vanílico e o ácido sirínico (Figura 2) (Albuquerque *et al.*, 2020; Cunha & Roque, 2014a).

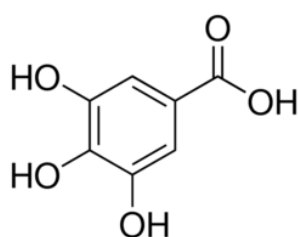


Figura 1: Estrutura química do ácido gálico (Gao *et al.*, 2019).

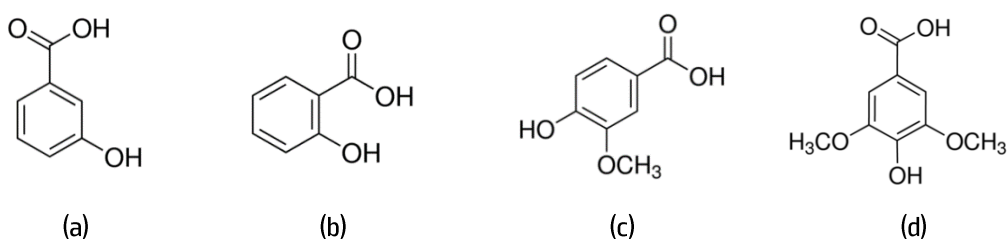


Figura 2: Estrutura química do ácido *p*-hidroxibenzóico (a), ácido *o*-hidroxibenzóico (b), ácido vanílico (c) e ácido sirínico (d) (Cunha & Roque, 2014a).

Os ácidos fenólicos, como o ácido *p*-cumárico, o ácido cafeico (ACF), o ácido ferúlico, o ácido clorogénico (ACL) e o ácido sináptico (Figura 3 e 4) são derivados do ácido cinâmico, encontram-se geralmente sob a forma de heterósidos fenilpropanóides (C₆-C₃), e são os mais difundidos na natureza (Cunha & Roque, 2014a).

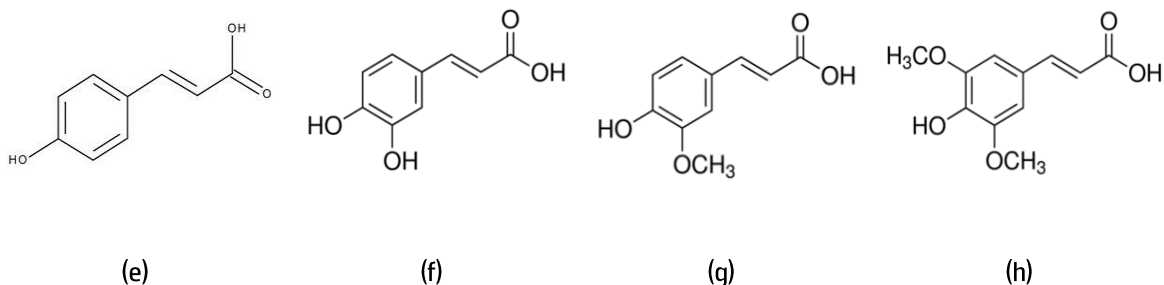


Figura 3: Estrutura química do ácido *p*-cumárico (e), ácido cafeico (f), ácido ferúlico (g) e ácido sináptico (h) (Cunha *et al.*, 2010).

Os ácidos clorogénicos são ácidos fenólicos com grupos hidroxilo em resíduos aromáticos que derivam da esterificação de ácidos cinâmicos (incluindo ácido cafeico, ferúlico e *p*-cumárico) com o ácido quínico (Figura 4) (Oliveira & Bastos, 2011).

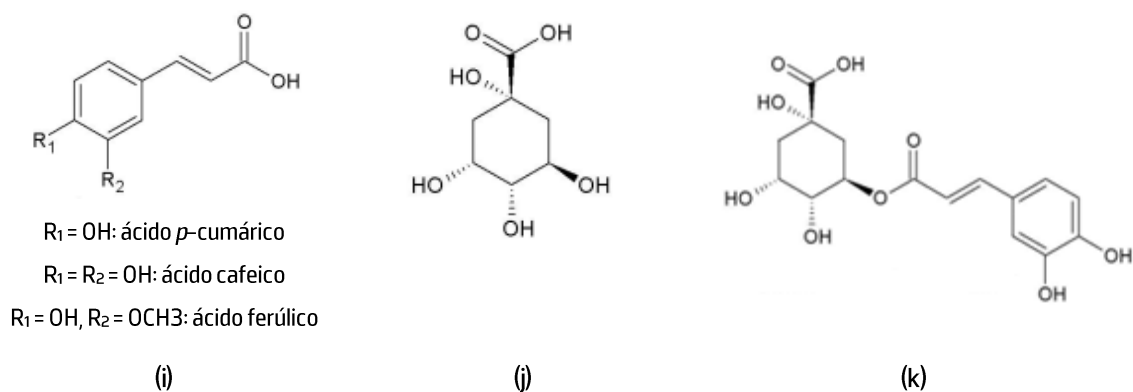


Figura 4: Estrutura química de alguns ácidos fenólicos (ácido *p*-cumárico, ácido cafeico e ácido ferúlico) (i), do ácido quínico (j) e de um ácido clorogénico (k) (Oliveira & Bastos, 2011).

Recentemente, as plantas contendo estes compostos têm sido estudadas em relação à atividade antioxidante (Cunha & Roque, 2014a; Irakli *et al.*, 2012a). Segundo Cunha *et al.* (2010), muitos ésteres heterósidos fenilpropanóides, inibem a adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) e a aldo-reductase, que por sua vez inibem a formação de leucotrienos e hidroperóxidos, apresentando uma ação benéfica no caso das doenças inflamatórias. O estudo de Albuquerque *et al.* (2020), descreveu as propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antitumorais e neuroprotetoras do AG, e as atividades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antivíricas e antitumorais do ACF.

b. Cumarinas

Existem cerca de 1300 cumarinas, todas derivadas do 5,6-benzo-2-pirona (α -cromona) resultantes da existência de substituintes (OH, OCH₃, CH₃) no anel benzênico, distinguindo-se as cumarinas simples (ex: escopoletina, esculetina, esculina, herniarina e a umbeliferona), as C-preniladas (osteol) e as O-preniladas (aurapteno) (Cunha *et al.*, 2010).

c. Lignóides (lignananas, neolignananas e compostos aparentados)

Os lignóides subdividem-se em vários grupos, as lignanas (mais importantes biologicamente), as neolignananas e as flavonolignananas. Do ponto de vista da estrutura molecular, os lignóides são formados exclusivamente pelo grupo fenilpropanóide (C₆-C₃) (Cunha *et al.*, 2010).

d. Flavonóides

Os flavonóides são moléculas de baixo peso molecular, têm várias funções na natureza, constituem um vasto grupo de metabolitos secundários com atividades biológicas muito diversas e encontram-se geralmente sob a forma de ésteres ou, mais frequentemente, sob a forma de heterósidos (Campos, 2014). Os flavonóides incluem um grupo de moléculas que divergem em pequenas partes da sua estrutura básica de flavona (2-fenil-benzopirona) (Figura 5), compreendem dois anéis aromáticos (anel A e B), que são unidos por três carbonos formando um anel heterocíclico (anel C), sendo constituídos por quinze átomos de carbono, organizados na configuração C₆-C₃-C₆ (Campos, 2014; Feng *et al.*, 2017).

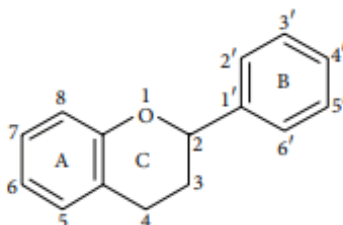
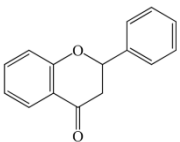
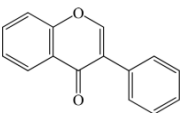
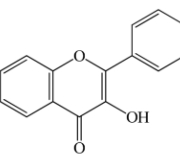
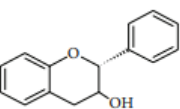
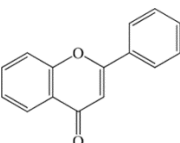
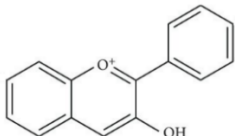


Figura 5: Estruturas da cadeia 2-fenil-benzopirona, com sistema de anel-A benzoil e anel-B hidroxicinamoil (Kumar & Pandey, 2013).

De acordo com a ligação entre os anéis B e C e os padrões de substituição do anel C, os flavonóides são divididos em seis subgrupos diferentes: flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis, flavonas e antocianidinas (Tabela I) (Alara *et al.*, 2021; Albuquerque *et al.*, 2020). As estruturas predominantes dos flavonóides incluem as flavonas, os flavonóis e as flavanonas e encontram-se normalmente na forma osídica (Campos, 2014; Cunha *et al.*, 2010). A apigenina e a luteolina são exemplos de flavonas; o campferol, a quercetina e a rutina (RUT) de flavonóis, e a hesperidina (HESP) e a naringina (NARG) pertencem à classe das flavanonas (Cunha *et al.*, 2010; Kumar & Pandey, 2013).

Tabela I: Estrutura química das principais classes de flavonóides e compostos relacionados (*adaptado de Campos, 2014; Feng et al., 2017*).

Classe de flavonóides	Estrutura química	Exemplos de Compostos
Flavanonas		Naringenina Naringina Hesperidina Eridioctiol
Isoflavonas		Daidzeína Genisteína
Flavonóis		Campferol Rutina Quercetina Mircetina
Flavanóis		Catequina Epicatequina
Flavonas		Apigenina Luteolina
Antocianidinas		Pelargonidina Cianidina Peonidina Delfinidina

As várias classes de flavonóides são capazes de modular a atividade de determinadas enzimas e modificar o comportamento de vários sistemas celulares. São compostos com diferentes atividades biológicas, dependendo das suas estruturas químicas, nomeadamente propriedades antioxidantes, anticarcinogénicas, antivíricas, antialérgicas, vasoprotetoras, anti-inflamatórias, “estrogénio-like”, “benzodiazepine-like”, entre outras (Campos, 2014; Feng *et al.*, 2017; Ghedira, 2005).

e. Taninos

Os taninos são substâncias de natureza fenólica, com peso molecular entre 500 e 3000 Da, hidrossolúveis, capazes de formar complexos insolúveis com os alcalóides, gelatina e outras proteínas. Tendo em conta as características estruturais, podem ser classificados em taninos hidrolisáveis (galhotaninos e elagitaninos), taninos complexos e taninos condensados ou proantocianidinas (Cunha &

Batista, 2014; Cunha *et al.*, 2010). Na terapêutica, os taninos são utilizados no tratamento de diarreias, como anti-inflamatórios, antissépticos e hemostáticos. Devido à capacidade de precipitarem alcalóides (exceto a morfina) e metais pesados, podem ser utilizados como antídoto nos envenenamentos com estes compostos (Cunha *et al.*, 2010).

f. Compostos quinónicos

As benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e naftodiantronas são exemplos de quinonas presentes na natureza, sendo muitas dessas moléculas dotadas de atividade farmacológica (Cunha & Roque, 2014c). Alguns compostos fenólicos são corados e podem ser utilizadas várias reações de coloração na identificação de compostos fenólicos, diretamente ou após o isolamento dos compostos. A cromatografia líquida, nomeadamente com detetores de espectrometria de ultravioleta – visível (UV-Vis), como o detetor de fotodíodos (DAD), ou espectrometria de massa (MS) permitem uma identificação e doseamento destes compostos fenólicos (Cunha & Roque, 2014b).

1.3. Plantas do género *Euphorbia*

O género *Euphorbia*, da família Euphorbiaceae, é o terceiro maior género de plantas angiospérmicas (*Astragalus*, *Bulbophyllum*, *Psychotria*, *Euphorbia*, *Carex*, *Begonia*) e tem uma distribuição maioritariamente na Europa e no Mediterrâneo (Özbilgin *et al.*, 2018; Salehi *et al.*, 2019). Esta família é muito diversa em termos de distribuição e morfologia, sendo composta por espécies que crescem principalmente como pequenos a grandes arbustos, ervas daninhas, grandes árvores ou como trepadeiras (Kemboi *et al.*, 2020). O género *Euphorbia* é caracterizado pela produção de um látex leitoso irritante (Amtaghri *et al.*, 2022; Vasas & Hohmann, 2014). Estão reconhecidas mais de 2000 espécies, sendo utilizadas na medicina tradicional em todo o mundo no tratamento de vários distúrbios de saúde e doenças (Ghani *et al.*, 2020; Magozwi *et al.*, 2021; Salehi *et al.*, 2019). O género *Euphorbia* foi descrito no século XVIII, por Carl Lineu, juntamente com uma variedade de usos medicinais, que incluem a sua utilização em tratamentos tópicos e o efeito purgativo gastrointestinal (Ernst *et al.*, 2015).

O género *Euphorbia* apresenta características xerofíticas, contudo, alguns compostos são tóxicos, resultantes de uma estratégia evolutiva de defesa das plantas contra predadores (ex: herbívoros) (Evans, 2002; Salehi *et al.*, 2019).

Algumas espécies de *Euphorbia* são utilizadas, tradicionalmente, no tratamento de doenças respiratórias, gonorreia, indigestão, inflamação, enxaquecas, parasitas intestinais, alívio de irritações cutâneas, cicatrização de feridas e verrugas e também como fonte de alimento (Magozwi *et al.*, 2021; Özbilgin *et al.*, 2018). As aplicações medicinais deste género têm sido atribuídas à presença de diversos compostos, como flavonóides, diterpenos e triterpenos (Hassan, 2022; Magozwi *et al.*, 2021). São várias as partes das plantas do género *Euphorbia* que podem ser utilizadas e têm sido estudadas do ponto de

vista químico e farmacológico (ex: planta inteira, caules, raízes, sementes, látex e folhas) (Salehi *et al.*, 2019; Vasas & Hohmann, 2014).

A composição química pode variar de acordo com a espécie, parte da planta utilizada e a técnica extrativa. O local de cultivo, as condições edafo-climáticas e a data da colheita também influenciam a variabilidade na composição química (Salehi *et al.*, 2019).

Estudos fitoquímicos demonstraram que os extratos de espécies *Euphorbia* contêm diferentes compostos como diterpenóides, incluindo o jatrofano, o latirano, o mirsinano, mas também do tipo tigliano, ingenano, dafnano, paraliano, pepluano; sesquiterpenos (ex: eufanginol, clovandiol, euforbiósido A, euforbiósido B); flavonóides (ex: rutina, campferol, miricetina, quercetina); terpenos voláteis (ex: terpineno, linalol, α -terpineol, β -cariofileno, α -humuleno; taninos; triterpenos (ex: lupeol, betulina, β -amirina) e fitosteróis (ex: β -sitosterol) (Özbilgin *et al.*, 2018; Salehi *et al.*, 2019).

Os compostos presentes em espécies de *Euphorbia* têm demonstrado importantes atividades biológicas no tratamento de muitas patologias, nomeadamente, atividade citotóxica e anticancerígena, anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, antiproliferativa, antidiarreica, e ainda, a inibição da cadeia respiratória mitocondrial de mamíferos, a inibição do vírus da imunodeficiência humana - tipo 1 (VIH-1) e moduladora de resistência a múltiplos fármacos (RMF) (Magozwi *et al.*, 2021; Özbilgin *et al.*, 2018; Salehi *et al.*, 2019).

O interesse pelas atividades biológicas de espécies de *Euphorbia* iniciou-se com o isolamento e elucidação da estrutura do forbol-12,13-diéster da planta *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae), com propriedades promotoras de tumor, em 1968, e a descrição da atividade antitumoral de um diterpeno isolado de *Euphorbia esula* L. em 1976 (Ernst *et al.*, 2015).

Na Farmacopeia Chinesa encontram-se registadas cinco espécies do género *Euphorbia*: *Euphorbia pekinensis*, *Euphorbia kansui*, *Euphorbia lathyris*, *Euphorbia humifusa* e *Euphorbia maculata*, para o tratamento de gonorreia, edema, enxaquecas e verrugas (Jannet *et al.*, 2017; Vasas & Hohmann, 2014).

Em relação à presença de óleos essenciais em espécies do género *Euphorbia*, Salehi *et al.* (2019) demonstraram que a maioria dos óleos essenciais presentes nas espécies estudadas apresentam propriedades antioxidantes, especialmente através do mecanismo de eliminação de radicais livres. No entanto, o mesmo estudo salienta também a existência de muitas espécies de *Euphorbia* cujo conteúdo em óleos essenciais ainda não foi estudado, evidenciando uma lacuna no conhecimento sobre o potencial dessas espécies (Salehi *et al.*, 2019).

Em 2012, foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), e em 2013 pela *European Medicines Agency* (EMA), o gel tópico Picato® (mebutato de ingenol), um diterpeno isolado de *Euphorbia peplus* L., para o tratamento de queratose actínica, uma doença pré-cancerígena da pele devido à sua capacidade de inibir a proteína cinase C (PKC), despertando o interesse em produtos naturais de espécies de *Euphorbia* (Ernst *et al.*, 2015; Vasas & Hohmann, 2014). No entanto, a sua Autorização de Introdução no

Mercado (AIM) foi revogada em 2020 devido a Picato® apresentar um perfil de benefício–risco negativo (Infarmed, 2020).

1.3.1. *Euphorbia paralias*

1.3.1.1. Características gerais

Euphorbia paralias (*E. paralias*) ou *Esula paralias* (L.) Fourr., *Euphorbia malacitana* Pau, *Euphorbion paralium* (L.) St.-Lag., *Galarhoeus paralias* (L.) Haw., *Tithymalus maritimus* Lam. ou *Tithymalus paralias* (L.) Hill, vulgarmente conhecida como morgaheira-das-praias, pertence à família de plantas Euphorbiaceae e distribui-se principalmente nas areias marítimas do Mar do Norte, ao longo das costas do Oceano Atlântico, do Mediterrâneo e Macaronésia (Figura 6) (Al-Yousef *et al.*, 2021; Jardim Botânico UTAD, *s.d.-b*). Esta espécie angiospérmica apresenta um período de floração entre Março e Novembro (Jardim Botânico UTAD, *s.d.-b*).



Figura 6: Espécie *E. paralias* (Jardim Botânico UTAD, *s.d.-b*).

Em Portugal, esta espécie perene resistente distribui-se sobretudo na região Litoral, como o Noroeste Ocidental, Região Centro-Oeste, Centro-Sul e Região do Barlavento e Sotavento (Figura 7) (Jardim Botânico UTAD, *s.d.-b*).



Figura 7: Distribuição em Portugal da espécie *E. paralias* (Jardim Botânico UTAD, s.d.-b).

1.3.1.2. Composição química

Apesar do aumento das publicações sobre o género *Euphorbia*, a espécie *E. paralias* tem sido pouco explorada. Estudos sobre a composição química de *E. paralias* revelaram o isolamento e identificação de compostos tais como flavonóides, diterpenos e triterpenos (Al-Yousef *et al.*, 2021; Refahy, 2011). Desta forma, foram identificados vários terpenos como pré-segetanina, segetanina A, segetanina B, segetenos A, segetenos B, paralinona A, paralinona B, e outros diterpenos como o segetano, jatrofanos e paralianos (Hlila *et al.*, 2016). Também o estudo de Vasas & Hohmann (2014) mencionou os compostos jatrofano, ingenano, segetano, paraliano e pepluano, como diterpenos isolados desta espécie até ao momento. Relativamente aos compostos fenólicos, alguns flavonóides foram isolados de *E. paralias* como a quercetina 3-*O*-galactósido e o campferol-3- β -D-glicósido, bem como o β -sitosterol, que também foi isolado desta espécie (Hlila *et al.*, 2016). Por sua vez, no estudo de Al-Yousef *et al.* (2021) foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de ultra eficiência, associada a espectrometria de massa e onda de ionização por *electrospray* (UPLC-ESI-MS/MS), cinco compostos fenólicos, incluindo dois ácidos fenólicos (ácido elágico e AG) e três glicosídeos de flavonóis, respetivamente, campferol-3-*O*- β -(6"-galloil-*O*-glicopiranósido) (14 mg), quercetina-3-*O*-glicopiranósido (12 mg) e a quercetina-3-*O*- β -D-arabinopiranósido (13 mg), presentes em extratos de acetato de etilo de *E. paralias*, proveniente da costa de Alexandria (Egito). Num outro estudo de Ghani *et al.* (2020), os compostos fenólicos, incluindo os flavonóides identificados nos extratos de acetato de etilo de *E. paralias* constituíram 77,10% dos extratos. No total de trinta e dois compostos identificados por cromatografia líquida de elevada

eficiência (HPLC) com detetor MS, em extratos de *E. paralias* e *Euphorbia geniculata*, 22,0% correspondiam a ácidos fenólicos em *E. paralias* e 11,48% em *E. geniculata*, respectivamente. Segundo o mesmo estudo, verificou-se a presença dos ácidos hidroxibenzóicos (ácido elágico e AG) nestas duas espécies de *Euphorbia*. O elagitanino tetragaloil-*O*-hexósido foi identificado como um dos principais componentes nos extratos de acetato de etilo de *E. paralias* (22,0%). Os flavonóides campferol-3-*O*- β -(6"-galloil-*O*-glicopiranosídeo) e glicósidos de quercetina foram os principais flavonóides encontrados no extrato de *E. paralias*, enquanto a RUT e outros glicósidos de quercetina (ex: arabinósido e ramnósido) foram mais abundantes no extrato de *E. geniculata*. A presença de apigenina foi também identificada nos extratos de *E. paralias* analisados. A percentagem do composto campferol (22%) também foi significativa no extrato de acetato de etilo de *E. paralias* (Ghani *et al.*, 2020).

1.3.1.3. Usos tradicionais e atividades biológicas

As partes aéreas da espécie *E. paralias* são utilizadas tradicionalmente na China para o tratamento do cancro (Amtaghri *et al.*, 2022). Os compostos fenólicos e terpenos presentes em *E. paralias* têm demonstrado atividade citotóxica contra linhas celulares de leucemia mieloide aguda humana (THP-1), com valores para a concentração inibitória para 50% das células (IC₅₀) de 54,58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Jannet *et al.*, 2017). Segundo o estudo de Safwat *et al.* (2018), no qual foram testados vários extratos de plantas, o extrato de *E. paralias* foi o que apresentou maior atividade antimicrobiana contra micobactérias não tuberculosas com valores de concentração mínima inibitória (CMI) de 0,53 mg/mL contra *Mycobacterium phlei*, 3,13 mg/mL contra *Mycobacterium smegmatis* e 3,9 mg/mL contra *Mycobacterium tuberculosis*.

O estudo de extratos de plantas inteiras de *E. paralias* efetuada por Safwat *et al.* (2018) revelou a presença de quercetina-3-*O*- β -*D*-glicósido, que apresentou uma toxicidade moderada contra linhas celulares cancerígenas hepáticas (HepG2) e de pulmão (A549) com valores de IC₅₀ de 19 e 16,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Segundo este mesmo estudo comprovou-se que a quercetina-3-*O*- β -*D*-glicósido possui a capacidade de inibir a enzima glutamina sintase, e, por conseguinte, a inibição desta enzima poderá ser um alvo potencial no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, nomeadamente, no desenvolvimento de um potencial agente antituberculoso contra o *M. tuberculosis* (Safwat *et al.*, 2018).

Por sua vez, o estudo de Al-Yousef *et al.* (2021), permitiu demonstrar as atividades nefroprotetora, citotóxica e antioxidante de *E. paralias*. Os flavonóides presentes nos extratos de *E. paralias* e *E. geniculata* demonstraram uma elevada atividade antioxidante e capacidade hepatoprotetora em comparação com o fármaco padrão silimarina, evidenciado pela melhoria significativa das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina total, peroxidação lipídica (malondialdeído (MDA)), parâmetros relacionados com o stress oxidativo (catalase

(CAT), glutationa redutase (GSH) e superóxido dismutase (SOD)) e do perfil lipídico (Ghani *et al.*, 2020). O estudo realizado por Hlila *et al.* (2017) com extratos de acetona e clorofórmio das partes aéreas (folhas e caules) de *E. paralias* demonstraram a atividade antimicrobiana desta espécie contra cinco estirpes bacterianas: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e contra o fungo *Candida albicans*. O extrato clorofórmico apresentou uma atividade antibacteriana, com um halo de inibição de 13 mm, contra *P. aeruginosa* em comparação com a gentamicina (14 mm), e também contra o *B. subtilis*, com um halo de inibição igual a 11 mm, e que se aproximava do produto de referência (12 mm). Da mesma forma, o extrato de acetona das folhas mostrou-se eficaz contra *C. albicans* (halo de inibição de 10 mm) quando comparado com a gentamicina (11 mm) (Hlila *et al.*, 2017).

1.3.2. *Euphorbia hirsuta*

1.3.2.1. Características gerais

Euphorbia hirsuta (*E. hirsuta*) ou *Euphorbia pubescens* Vahl ou *Tithymalus pubescens* (Vahl) Samp., vulgarmente conhecida como ésula-lanosa ou titímalo-lanoso, pertence à família de plantas Euphorbiaceae e distribui-se principalmente sobre substratos rochosos ou relvados húmidos, na Região Mediterrânica e Macaronésia (Figura 8) (Jardim Botânico UTAD, *s.d.-a*). Esta espécie angiospérmica apresenta um período de floração entre Janeiro e Outubro (Jardim Botânico UTAD, *s.d.-a*).



Figura 8: Espécie *E. hirsuta* (Jardim Botânico UTAD, *s.d.-a*).

Em Portugal, esta espécie distribui-se sobretudo na região Litoral, Noroeste ocidental e em toda a Região Centro e Sul, com exceção da Região Centro-Norte (Figura 9) (Jardim Botânico UTAD, *s.d.-a*).



Figura 9: Distribuição em Portugal da espécie *E. hirsuta* (Jardim Botânico UTAD, s.d.-a).

1.3.2.2. Composição química

São escassos os estudos com referência a compostos ativos desta planta. Porém, um estudo realizado em Portugal sobre esta espécie de *Euphorbia* permitiu a descoberta de três diterpenos macrocíclicos com o esqueleto de jatrofano, denominados pubescenes A, B e C, e os compostos conhecidos indole-3-aldeído e escopoletina, os quais foram isolados e caracterizados de toda a planta seca de *E. hirsuta* (Valente *et al.*, 2003).

1.3.2.3. Usos tradicionais e atividades biológicas

Um estudo efetuado por Azaizeh *et al.* (2006), destacou a ação antiparasitária de *E. hirsuta* entre uma lista selecionada de importantes espécies de plantas raras e ameaçadas, usadas tradicionalmente no tratamento de doenças humanas ou como pesticidas na região leste do Mediterrâneo. Esta também descreveu o seu uso medicinal em Espanha, em patologias da pele (González-Tejero *et al.*, 2008).

1.4. Métodos analíticos

Os avanços e aperfeiçoamento dos métodos analíticos e o desenvolvimento de bioensaios permitiram aumentar o conhecimento sobre as plantas medicinais, nomeadamente, um melhor conhecimento da composição química e estrutural dos seus compostos ativos. O desenvolvimento dos métodos cromatográficos, espectrométricos e radioimunológicos permitiram, conseqüentemente, um

maior controle na qualidade, e uma intervenção mais precisa nas etapas de obtenção, cultura, colheita, preparação e armazenamento dos fármacos vegetais, bem como, nos processos industriais que envolvem o isolamento dos seus compostos ativos (Cunha & Roque, 2014d; Kecal *et al.*, 2022).

1.4.1. Cromatografia

O método cromatográfico foi descrito pela primeira vez em 1906, pelo botânico Mikhail Tsvett, e foi inicialmente aplicado na separação de pigmentos de folhas a partir de um extrato vegetal, utilizando uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio como fase estacionária (FE), e éter de petróleo, como fase móvel (FM) (Harris, 2007; Pinto, 2011). Atualmente, a cromatografia constitui uma das técnicas mais versáteis e utilizadas, sendo amplamente aplicada nas diferentes áreas da ciência, pois permite a separação de misturas complexas e difíceis de executar por outros métodos; a separação de compostos existentes em baixas concentrações e a realização de três objetivos fundamentais em análise química: purificação, identificação e doseamento (Pinto, 2011).

A cromatografia é um método físico de separação no qual os componentes da amostra a serem separados são distribuídos entre duas fases (FE e FM) à medida que os compostos percorrem um meio de suporte (Pincus *et al.*, 2022; Pinto, 2011). Os compostos que interagem mais fortemente com a FE ficam retidos por mais tempo comparativamente com os que têm mais afinidade para a FM (Pincus *et al.*, 2022). Este método de separação permite o estabelecimento dos perfis cromatográficos de extratos complexos e pode ser usado como termo comparativo mesmo que os constituintes não tenham todos a sua estrutura química totalmente elucidada (Campos, 2014). As técnicas cromatográficas podem ser classificadas de acordo com a FM, em cromatografia gasosa (quando a FM é um gás), e cromatografia líquida (quando a FM se encontra no estado líquido) (Mallik *et al.*, 2008; Pincus *et al.*, 2022).

1.4.1.1 Cromatografia líquida de elevada eficiência

Este tipo de cromatografia, HPLC, surgiu no final da década de 1960, com vantagens relativamente a outras formas de cromatografia líquida e, mesmo, gasosa (Pincus *et al.*, 2022). É uma técnica muito utilizada na química analítica e tem a capacidade de separar, identificar e quantificar os compostos que estão presentes numa mistura, tendo sido amplamente utilizada no isolamento e análise de flavonóides e outros tipos de compostos naturais (Feng *et al.*, 2017). Na HPLC, a separação dos componentes de uma mistura baseia-se em diferentes princípios físico-químicos, dependendo da natureza das FE e FM utilizadas, nomeadamente a partição, a adsorção, a afinidade, a troca iónica e a exclusão molecular (Pincus *et al.*, 2022; Pinto, 2011). As separações por HPLC apresentam uma resolução e sensibilidade elevadas face a outros métodos e, para tal, as amostras são sempre dissolvidas num solvente adequado e analisadas em solução (Campos, 2014; Pinto, 2011).

Nesta técnica são utilizadas bombas mecânicas especiais que produzem uma elevada pressão no sistema cromatográfico, e por conseguinte, a passagem da FM através da coluna (Pincus *et al.*, 2022). Resumidamente, a solução contendo a amostra a analisar, é introduzida no sistema cromatográfico, e a amostra, juntamente com a FM, é forçada a atravessar a FE sob grande pressão, já que esta contém partículas muito finas, permitindo separações de elevada resolução e eficiência (Harris, 2007; Pinto, 2011). Os componentes de um aparelho de HPLC (Figura 10) consistem, essencialmente, numa FM líquida contida em recipientes, uma bomba mecânica de alta pressão, uma válvula de injeção de amostra (injetor manual ou automático), uma coluna cromatográfica (onde está contida a FE), um detetor e um sistema de recolha de dados, normalmente um computador, para controlar o sistema e mostrar os resultados (Harris, 2007; Pincus *et al.*, 2022). Alguns equipamentos incluem um forno para controlo da temperatura da coluna (Harris, 2007). Este sistema de cromatografia, requer equipamento apropriado pois pode operar desde a temperatura ambiente até cerca de 200°C, e a pressões até 200 atmosferas (20.265 kPa). Fazendo uso de bombas peristálticas de alta precisão, o fluxo e a composição da FM pode ser modificado durante a análise de forma fácil e rigorosa. A quantidade de amostra a analisar na cromatografia analítica é habitualmente reduzida (1 a 100 μL) e pode ser medida com elevada precisão, utilizando detetores capazes de funcionar com fluxos contínuos de FM e de detetar quantidades de analito muito pequenas (Pinto, 2011).

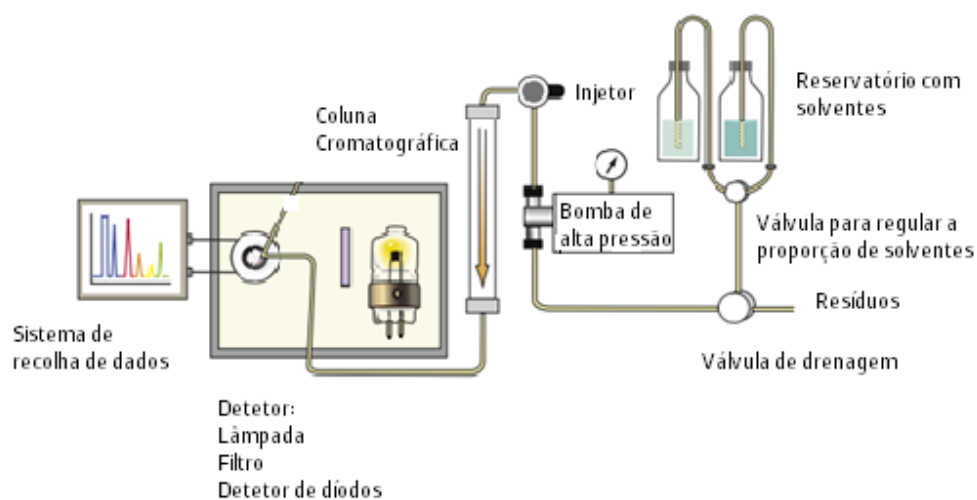


Figura 10: Componentes de um aparelho de HPLC (Adaptado de Pincus *et al.*, 2022).

A bomba ou sistema de bombas de alta pressão devem garantir um fluxo de FM constante e reprodutível e devem permitir transportar os líquidos contidos nos reservatórios nas proporções selecionadas (FM), e com o fluxo requerido ao longo de todo o sistema cromatográfico. O fluxo é eletronicamente programável em incrementos de 0,1 % (v/v) (Pinto, 2011). Apesar da elevada pressão que estas bombas geram, não exceder a pressão operacional do equipamento é um dos critérios

importantes no desenvolvimento do método cromatográfico, e manter a pressão abaixo de 15 MPa (150 bar), pois irá prolongar a vida útil da bomba, das válvulas, dos *seals* e do amostrador automático. A pressão do sistema pode duplicar durante a vida útil de uma coluna devido ao desgaste progressivo. No entanto, estabelecer uma pressão de operação superior a 15 MPa durante o desenvolvimento do método irá potencializar a degradação da coluna (Harris, 2007). Na eluição em modo isocrático é utilizada uma FM composta por um único solvente (ou mistura de solventes com composição constante), enquanto na eluição em gradiente observa-se uma variação na composição da FM ao longo da separação cromatográfica. Assim, na eluição em gradiente, quantidades crescentes de um solvente B são adicionadas ao solvente A para criar um gradiente contínuo, com a finalidade de obter a melhor resolução por unidade de tempo (Harris, 2007; Pinto, 2011). Na análise em gradiente, é fundamental um sistema que contenha, pelo menos, dois reservatórios (sistema binário), mas também são frequentes os sistemas ternários e quaternários, que permitem uma maior flexibilidade. Todos os solventes utilizados em HPLC devem ser previamente desgaseificados, uma vez que, as bolhas de ar criam dificuldades com bombas, colunas e detetores (Pinto, 2011).

A coluna cromatográfica contém a FE, na qual ocorre a separação cromatográfica. A coluna pode estar dentro de um forno (que pode ser aquecido), permitindo otimizar o processo de separação (Pinto, 2011). São utilizadas colunas cromatográficas de aço ou plástico de pequenas dimensões (3 a 30 cm de comprimento, e 1 a 5 mm de diâmetro interno). A natureza da FE pode ser diversa mas é, habitualmente, constituída por partículas de dimensões muito reduzidas, o que origina pressões elevadas no sistema, aquando da passagem da FM. No entanto, a eficiência de uma coluna aumenta à medida que o tamanho das partículas da FE diminui. Neste tipo de cromatografia líquida são utilizados vários tipos de fases estacionárias, sendo as mais frequentes as quimicamente modificadas (Harris, 2007; Pinto, 2011). A natureza da fase ligada é um parâmetro determinante para as propriedades de separação do sistema cromatográfico, sendo as fases ligadas mais utilizadas (conferem lipofilia à FE), o octilo (C_8); octadecilo (C_{18}); fenilo (C_6H_5); cianopropilo (CN) e aminopropilo (NH_2) (Pinto, 2011).

Na cromatografia líquida em fase normal, os solventes utilizados são de baixa polaridade e a FE polar, sendo que a força do eluente aumenta à medida que a polaridade do solvente também aumenta. Por sua vez, na cromatografia em fase reversa (RP) utilizam-se fases móveis aquosas, com ou sem modificadores orgânicos, e portanto, a FE é apolar ou fracamente apolar e o solvente é mais polar, neste caso, a força do eluente aumenta à medida que a polaridade do solvente diminui (Harris, 2007; Pinto, 2011). A maior parte das separações assenta em mecanismos de partilha em RP, os quais utilizam solventes polares como FM, e sílica quimicamente modificada como FE (Pinto, 2011). As partículas de sílica microporosa com uma fase líquida ligada covalentemente, como grupos octadecil ($C_{18}H_{37}$), são a FE mais comum e permitem a separação de uma ampla gama de misturas quando o solvente é escolhido cuidadosamente. Assim, na escolha do solvente orgânico, poderão ser utilizadas combinações de

acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH) e tetra-hidrofurano com água (ou tampão aquoso) que fornecem uma gama suficiente de interações dipolares e de ligação de hidrogénio com os solutos, possibilitando a separação de um grande número de compostos em cromatografia de RP (Harris, 2007). Os sistemas eluentes são normalmente água-metanol ou água-acetonitrilo, e as colunas de RP de C₈ e C₁₈ são o esquema mais comum (Campos, 2014; Harris, 2007).

O sistema de introdução das amostras e padrões (injetor) pode ser manual ou automatizado (injetores automáticos). Em qualquer um dos casos, o injetor deve possuir um sistema de válvulas, ao qual se pode adaptar um reservatório (*loop*) calibrado e de capacidade conhecida (que varia de 2 a 1000 µL), para garantir que a quantidade injetada é rigorosamente sempre a mesma. Na posição de carga, uma seringa é usada para lavar e carregar o *loop*, à pressão atmosférica, com a amostra ou padrão a analisar (Pinto, 2011).

O detetor permite reconhecer os analitos à saída da coluna cromatográfica. O detetor ideal é sensível a baixas concentrações de cada analito, fornece uma resposta linear e não amplia os picos eluídos, além disso, a sua resposta não deve ser alterada com mudanças na temperatura e na composição do solvente. Os detetores medem um parâmetro físico-químico característico dos analitos em estudo. Na análise por HPLC podem ser utilizados diversos detetores, sendo os mais comuns os espectrofotímetros UV-Vis, incluindo os detetores de matriz de díodos (Araújo *et al.*; Pinto, 2011). O detetor UV-Vis não é considerado universal, pois muitas substâncias orgânicas não absorvem radiação ultravioleta (UV). A deteção dirige-se por um sistema de análise dos espectros UV e pode ser feita tanto em sistemas que só podem avaliar um comprimento de onda, como em detetores DAD, que permitem ler vários comprimentos de onda (Campos, 2014). Os DAD apresentam vantagens em relação aos espectrofotímetros de UV-Vis, uma vez que permitem monitorizar todos os comprimentos de onda simultaneamente, permitindo a seleção do melhor comprimento de onda para cada um dos compostos que se pretende pesquisar, aumentando dessa forma a sensibilidade do sistema, enquanto os detetores de UV-Vis apenas permitem a seleção de um só comprimento de onda, podendo este não ser o adequado para todos os compostos (Pinto, 2011).

A deteção pode também ser feita por fluorimetria, refratometria diferencial, métodos eletroquímicos, métodos óticos (como espectrometria ou espectrofotometria), ressonância magnética nuclear (RMN), bem como outros métodos particulares. Mais recentemente surgiram os detetores MS que são detetores universais e fornecem dados espectrais sobre os compostos em análise e permitem obter o espectro de massa de cada um dos analitos detetados (Pinto, 2011). Após o detetor, existe um registador que é um sistema computadorizado que permite converter os sinais do detetor em informação útil, como o cromatograma e o tratamento dos dados obtidos.

Um cromatograma apresenta a variação de um sinal ao longo do tempo e apresenta picos, que correspondem à representação gráfica da separação dos constituintes da amostra ou dos padrões, e

contém várias informações de relevância para a análise qualitativa e quantitativa (Campos, 2014) (Figura 11).

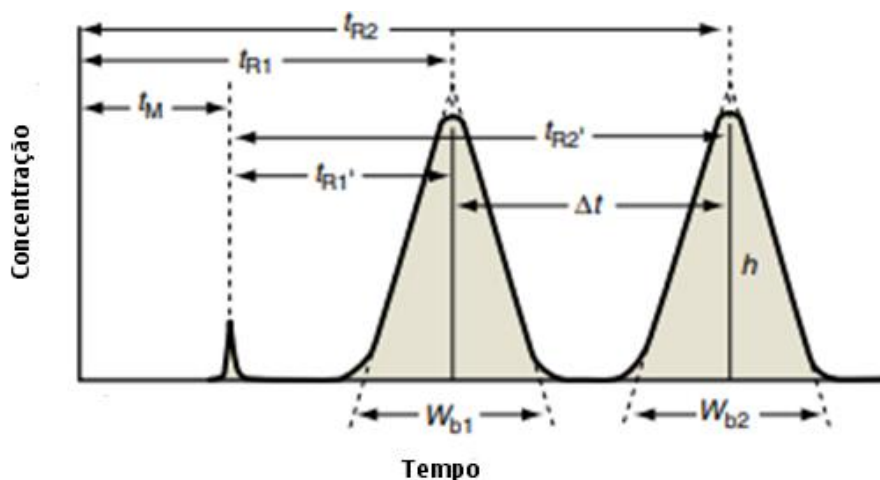


Figura 11: Representação esquemática de um cromatograma de separação de dois compostos e respectivos parâmetros cromatográficos: t_{R1} e t_{R2} correspondem ao tempo de retenção; t_{R1}' e t_{R2}' correspondem ao tempo de retenção corrigido; t_M corresponde ao tempo morto; W_{b1} e W_{b2} correspondem à largura do pico cromatográfico; h é a altura do pico cromatográfico (Adaptado de Pincus et al., 2022).

A área do pico cromatográfico (A), deve apresentar uma distribuição gaussiana e é proporcional à concentração do analito, sendo calculada tendo em conta a largura da base, W_b , e a altura do pico, h (Equação 1). O alargamento dos picos depende de processos físicos e não propriamente das diferenças no equilíbrio entre as duas fases (Pincus et al., 2022).

$$A = h \times W_b/2 \quad (1)$$

A concentração de um composto desconhecido numa amostra pode ser determinada através da integração das A ou através do método de padronização interna (Pincus et al., 2022). Na determinação quantitativa recorre-se a padrões, que correspondem aos constituintes maioritários. Para tal, é necessário injetar cinco concentrações gradativas do padrão, cada uma delas, pelo menos, três vezes. Através do cálculo da média aritmética das A obtidas para cada concentração, determina-se a equação da reta de calibração, e, por conseguinte, pode calcular-se a quantidade de padrão equivalente à amostra injetada (Campos, 2014).

O tempo de retenção (t_R) de um analito é o tempo que um composto em análise leva a eluir, ou seja, o tempo decorrido desde a injeção até o ponto máximo do pico, e o valor do t_R é característico de cada composto e está relacionado com a sua força de interação com a FE e a FM. Portanto, o seu valor pode ser utilizado na identificação e quantificação de um composto. A identificação dos picos numa amostra é feita por co-injeção com padrões e comparação dos t_R (Campos, 2014). No entanto, o tempo de retenção corrigido, t_R' , (Equação 2), tem em conta o tempo que a FM, ou qualquer composto não retido, demora a atravessar o sistema, e que corresponde ao tempo morto, t_M (Pincus et al., 2022).

$$t_{R'} = t_R - t_M \quad (2)$$

A temperatura da coluna afeta a retenção relativa dos diferentes compostos, sendo que o aumento da temperatura permite que a corrida cromatografia seja mais rápida, reduzindo os t_R (Harris, 2007). Mas a qualidade de uma separação cromatográfica pode ser expressa através de outros parâmetros (Figura 12) (Mallik *et al.*, 2008; Pinto, 2011). Para além dos parâmetros de retenção já referidos, existem parâmetros de distribuição e de eficácia que são essenciais para avaliar a análise cromatográfica: o fator de retenção (K'), o fator de separação (α) e o número de pratos teóricos (N) (Pincus *et al.*, 2022; Pinto, 2011). A separação pode ser otimizada tendo em conta os parâmetros independentes (K' , α e N), os quais podem variar em conjunto ou separadamente, sendo o K' o mais fácil de ser alterado, seguido do α (Mallik *et al.*, 2008; Pinto, 2011).

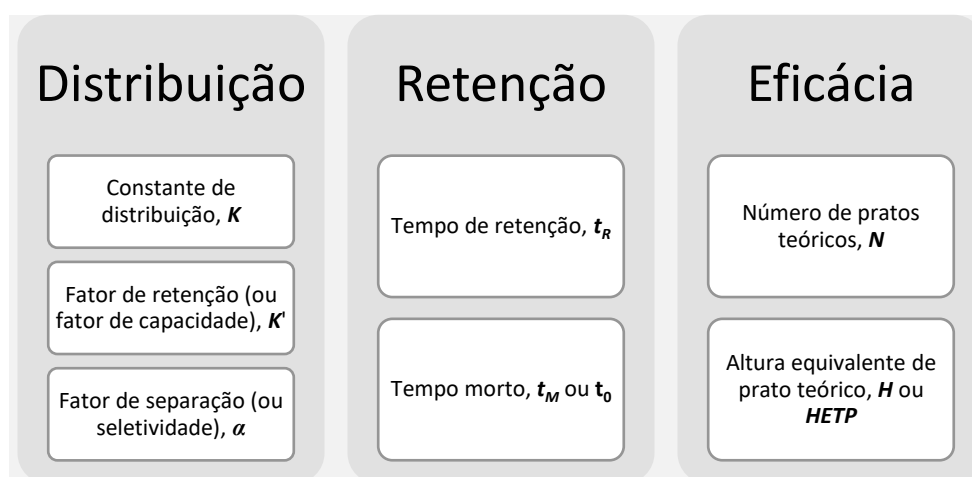


Figura 12: Parâmetros cromatográficos (Adaptado de Pinto, 2011).

O fator de retenção ou fator de capacidade, K' , é um parâmetro fundamental da retenção em cromatografia líquida, resulta da razão entre o número de moléculas do analito na FE e o número de moléculas do analito na FM (Equação 3), e permite descrever a migração de cada componente na coluna (Pinto, 2011). Este parâmetro é uma medida do t_R em unidades de tempo necessário para a FM ou um soluto não retido passe pela coluna (Harris, 2007).

$$K' = (t_R - t_M) / t_M \quad (3)$$

Os valores ideais de K' para dois componentes variam entre 1 e 10, e para múltiplos componentes são aceites valores entre 0,5 e 20. O K' pode ser melhorado alterando a composição da FM (Mallik *et al.*, 2008).

O fator de separação, α , mede a seletividade da separação para dois picos adjacentes, sendo medido pela relação entre os fatores de retenção dos mesmos (k_2/k_1), ou seja, indica qual o grau de separação de dois componentes de uma mistura (Pinto, 2011). O valor de α deve ser superior a 1, e quanto maior o

seu valor, maior será o afastamento dos dois picos. No entanto, α não tem em consideração a largura dos picos, e por conseguinte, não permite avaliar a qualidade da separação (Mallik *et al.*, 2008).

O número de pratos teóricos, N , é um parâmetro usualmente utilizado para avaliar a eficácia da coluna e mede a eficiência das condições cromatográficas, através dos t_R obtidos e da W_b (Equação 4). Como cada prato corresponde a uma etapa de equilíbrio do analito entre as duas fases, quanto maior N , maior a eficiência da separação (Pincus *et al.*, 2022; Pinto, 2011).

$$N = 16 (t_R/W_b)^2 \quad (4)$$

Um menor tamanho das partículas da FE leva a um maior N , pressão do sistema mais elevada, otimização do tempo da corrida e um menor limite de detecção (Harris, 2007).

Por último, deve ter-se em conta a resolução (R_s) do sistema, que mede a qualidade da separação entre cada dois compostos, ou seja, a capacidade de um sistema cromatográfico separar os componentes de uma mistura (amostra), e tem em consideração as W_b (em unidades de tempo) de dois picos adjacentes e os seus respetivos t_R , e deverá ser maior do que 1 (Equação 5) (Pinto, 2011). Os efeitos combinados da eficiência do solvente e eficiência da coluna são expressas na R_s (Pincus *et al.*, 2022).

$$R_s = (t_{R2} - t_{R1}) / 0,5(W_{b1} + W_{b2}) \quad (5)$$

Para aumentar a R_s , poderá ser necessário diminuir a taxa de fluxo, aumentar o comprimento da coluna ou diminuir o tamanho das partículas da FE. O aquecimento da coluna de cromatografia geralmente diminui a viscosidade do solvente, reduzindo a pressão necessária ou permitindo uma corrida mais rápida. No entanto, o aumento da temperatura diminui os t_R e melhora a R_s , acelerando a difusão dos solutos, mas o aumento da temperatura pode degradar a FE e diminuir a vida útil da coluna cromatográfica (Harris, 2007).

1.4.1.2 Métodos de quantificação de compostos fenólicos em *Euphorbia*

O HPLC é uma das técnicas analíticas mais utilizadas para a separação de componentes individuais em extratos vegetais, constituindo assim um importante elemento no controlo de qualidade de extratos de plantas (Campos, 2014; Nag *et al.*, 2020). No caso de espécies de *Euphorbia*, tem sido demonstrado que os estudos analíticos por HPLC, através da análise de compostos utilizados como biomarcadores e de correlações entre fatores biológicos e/ou efeitos tóxicos, podem ser úteis para uma melhor perceção dos mecanismos de ação e possíveis aplicações dessas espécies na terapêutica (Vasas & Hohmann, 2014). Na Tabela II encontram-se descritas as metodologias mencionadas na literatura para a quantificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida, em extratos de *Euphorbia*, e que serviram de base à metodologia desenvolvida neste trabalho.

Nos últimos anos tem havido um aumento no número de publicações referentes às propriedades químicas e farmacológicas do género *Euphorbia* (Ernst *et al.*, 2015). A maioria dos estudos publicados sobre espécies de *Euphorbia* concentram-se quase exclusivamente em diterpenos e triterpenos

isolados, sendo a referência aos flavonóides e outros constituintes fenólicos limitada (principalmente em termos de estudos de identificação de compostos presentes nos extratos) (Vasas & Hohmann, 2014).

Tabela II: Compilação de algumas metodologias para a determinação do perfil de compostos fenólicos em *Euphorbia* segundo vários autores.

Espécie(s)	Solvente de extração	Método analítico	FE	FM	Gradiente de eluição (% v/v)	Compostos analisados	Referência
<i>E. hirsuta</i> (planta inteira)	Metanol; N-hexano	HPLC-UV/RMN	Lichrospher® 100: RP-18 250 x 10 X 10	ACN/H ₂ O	Isocrático	Pubescenes A; Pubescenes B; Pubescenes C; Indole-3-aldeído; Escopoletina	(Valente <i>et al.</i> , 2003)
					Fluxo: 5 mL/min		
<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	Acetato de etilo	HPLC-UV	XB-C ₁₈ 150 x 4,6 x 5	CH ₃ CN - Solução aquosa de ácido fosfórico (H ₃ PO ₄) (30:70 % v/v)	Isocrático	Campferol; Quercetina; Mircetina	(Wang <i>et al.</i> , 2012)
					Fluxo: 1 mL/min a 30°C		
<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	(n.d.)	HPLC*	Ultimate 3000: C ₁₈ 4,6 mm x 150 x 5	Solução aquosa de ACN 20% (v/v) (pH = 3)	Isocrático	Ácido gálico; Ácido clorogénico; Ácido vanílico; Ácido ferúlico; Ácido p-cumárico; Rutina; Quercetina; Campferol	(Zhang <i>et al.</i> , 2017)
					Fluxo: 0,5 mL/min a 30°C		
<i>Euphorbia characias</i> L. (parte aérea)	N-hexano; Acetato de etilo; Metanol	HPLC*	ACE 5®: C ₁₈ 250 x 4,6 x 5	A: Solução aquosa de ácido fosfórico (H ₃ PO ₄) 0,2% (v/v) B: CH ₃ CN	0 min, 10% B; 0-20 min, 10-60% B; 20-25 min, 100% B	Quercetina-3-O-rhamnósido (Quercitrina); Quercetina-3-O-galactósido (Hiperósido); Quercetina-3-O-arabinósido (Guajjaverino)	(Özbilgin <i>et al.</i> , 2018)
					Fluxo: 1 mL/min a 40°C		
<i>E. paralias</i> L. (parte aérea)	Acetato de etilo	UPLC-ESI-MS/MS (modo negativo)	ACQUITY UPLC-BEH®: C ₁₈ -RP 1,7 x 2,1 x 50	A: Solução aquosa de ácido fórmico (CH ₂ O ₂) 0,1% v/v B: MeOH acidificado com 0,1% de CH ₂ O ₂	0-1 min, 20% B; 1-18 min, 20-90% B; 18-20 min, 20% B.	Elagitaninos; Ácido elágico; Ácido gálico; Campferol-3-O-β-(6"-galloil-O-glicopiranosido); Quercetina; Rutina	(Ghani <i>et al.</i> , 2020)
<i>E. geniculata</i> (parte aérea)					Fluxo: 0,2 mL/min		
<i>E. paralias</i> (parte aérea)	Acetato de etilo	UPLC-ESI-MS/MS (modo negativo)	ACQUITY UPLC-BEH®: C ₁₈ 1,7 x 2,1 x 50	A: Solução aquosa de CH ₂ O ₂ 0,1% (v/v) B: MeOH + 0,1% de CH ₂ O ₂	(n.d.)	Ácido gálico; Ácido elágico; Campferol-3-O-β-(6"-galloil-O-glicopiranosido); Quercetina-3-O-glicopiranosido; Quercetina-3-O-β-D-arabinopiranosido	(Al-Yousef <i>et al.</i> , 2021)
					Fluxo: 0,2 mL/min		

(n.d.): não definido

* o método de deteção não estava indicado

Estes fatos tornam ainda mais relevante a análise e a quantificação de compostos fenólicos nas espécies de *Euphorbia* existentes na costa portuguesa e da sua potencialidade como fonte de compostos bioativos.

1.5. Validação de métodos analíticos

O desenvolvimento de um método cromatográfico tem como finalidade obter uma separação adequada dos analitos num espaço temporal razoável para a sua execução. Idealmente, o método deve ser robusto, pelo que a separação cromatográfica não deverá ser afetada por pequenas variações nas condições (deterioração gradual da coluna, pequenas variações na composição do solvente, pH e temperatura, ou uso de um lote diferente da mesma FE) (Harris, 2007). Assim, de forma a garantir que um novo método analítico conduz a informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, o método deve ser alvo de uma validação, o que implica a obtenção de um conjunto de parâmetros estatísticos (Figura 13) (Ribani *et al.*, 2004). A validação do método analítico é fundamental, e tem como objetivo demonstrar que o mesmo é adequado para a finalidade pretendida, sendo um aspeto vital da garantia da qualidade analítica e produção de resultados credíveis (EMA, 1995; Ermer, 2005a). Nesse sentido, com o processo de validação pretende-se demonstrar que o método é adequado à quantificação do(s) analito(s), num certo nível de concentração e com exatidão satisfatória (Bishop & Murch, 2020).

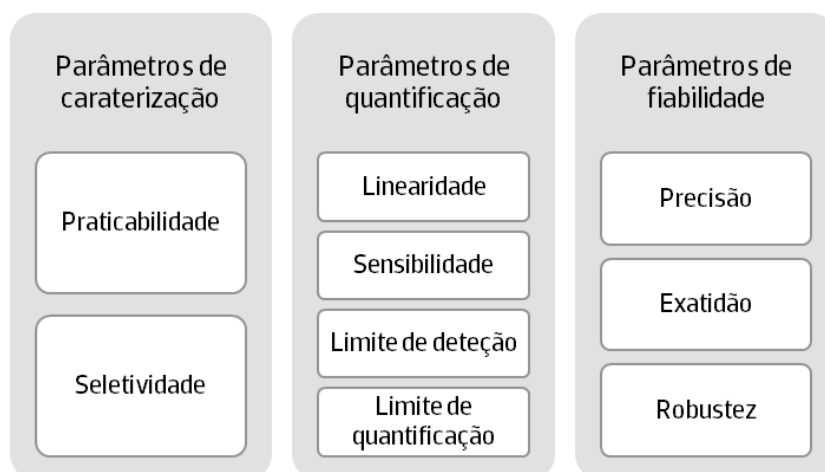


Figura 13: Parâmetros de validação de um método analítico (Adaptado de Ribani *et al.*, 2004).

Os parâmetros analíticos mínimos requeridos na validação de métodos analíticos dependem do tipo de método em causa e compreendem os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limiares analíticos (deteção e quantificação), sensibilidade, precisão, exatidão e robustez (RELACRE, 2000; Ribani *et al.*, 2004). Estes requisitos analíticos podem variar dependendo do tipo de método, já que, por exemplo, na análise qualitativa não há necessidade de determinar e validar o limite de quantificação (LOQ), a linearidade do método, a precisão e a exatidão, sendo os limites de deteção (LOD), a

seletividade/especificidade e a robustez os pontos mais importantes na validação de um método que não quantifica compostos. Por sua vez, num método de análise quantitativa, quando aplicado em gamas vestigiais, todos os requisitos mencionados são importantes. Os objetivos da validação de um método analítico pretendem: avaliar as características do método; controlar as variáveis que afetam a obtenção do resultado e estimar a incerteza global associada ao resultado (RELACRE, 2000).

1.5.1. Seletividade/Especificidade

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método analítico e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método (Ribani *et al.*, 2004). A seletividade avalia a capacidade de um método analítico identificar e distinguir a substância a analisar de outras substâncias relacionadas, como impurezas, produtos de degradação, ou outros compostos que possam estar presentes na amostra (EMA, 1995; ICH, 2005). A seletividade garante que o pico de resposta instrumental seja exclusivamente do composto de interesse. Em HPLC, a seletividade depende, essencialmente, do tipo de detetor utilizado, mas também varia de acordo com o tipo de composto analisado. A seletividade deve ser realizada de forma contínua durante a validação e execução do método. Deste modo, se a seletividade não for assegurada, outros parâmetros analíticos como a linearidade, a exatidão e a precisão poderão ser comprometidas (Ribani *et al.*, 2004).

1.5.2. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade de um método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um determinado intervalo de aplicação, ou seja, permite verificar se existe uma relação linear entre os valores medidos e as concentrações dos padrões de calibração (EMA, 1995; Ribani *et al.*, 2004). A linearidade do método pode ser avaliada por inspeção visual de um gráfico onde se representam os sinais de resposta (para HPLC é a área dos picos) em função da concentração da substância a analisar, que se denomina de reta de calibração (Ermer, 2005b). Para o estabelecimento da linearidade, as diretrizes do *International Conference on Harmonisation* (ICH) e da EMA especificam que se analise um mínimo de cinco níveis de concentração, por ordem crescente de concentração, e, no mínimo, três vezes de cada (EMA, 1995; ICH, 2005). O estudo dos parâmetros da reta de calibração (declive (m), ordenada na origem (b) e o coeficiente de correlação (R)) e a análise dos parâmetros de regressão obtidos pelo método dos mínimos quadrados (Equação 6), traduzem a relação linear dos dados experimentais, permitindo extrair informação sobre o método analítico.

$$y = m x + b \quad (6)$$

Na equação 6, γ é a resposta medida ou o sinal; m é o declive da reta; x é a concentração do analito; e b é a interseção com o eixo das ordenadas (ou ordenada na origem) (Ribani *et al.*, 2004).

O coeficiente de correlação, R , permite uma estimativa da qualidade da reta obtida, e, quanto mais próximo de 1,0 menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Aragão *et al.*, 2009). Assim, um R maior que 0,999 é considerado um ajuste ideal dos dados na regressão linear (Ribani *et al.*, 2004). Outras diretrizes indicam que, dependendo do método analítico, as retas de calibração devem ter valores de R superiores a 0,995 (RELACRE, 2000). Além disso, o método é considerado linear quando a resposta relativa se situa entre 95 e 105%, ou seja, quando a avaliação do desvio padrão do declive (s_m) em relação ao declive (m) de uma dada reta de calibração é inferior a 5%. Outro parâmetro de linearidade, é dado pela avaliação do desvio padrão da ordenada na origem (s_b), em relação à ordenada na origem (b), no qual o valor deve conter o zero ($b-s_b < 0 < b+s_b$) (ICH, 2005; Ribani *et al.* 2004).

1.5.3. Precisão

A precisão avalia o grau de proximidade (ou dispersão) entre resultados de uma série de medições repetidas de uma mesma amostra, de amostras semelhantes ou de uma solução padrão, em condições específicas pré-estabelecidas (RELACRE, 2000; Ribani *et al.*, 2004). Essa dispersão é normalmente avaliada através do coeficiente de variação (CV) (Equação 7) das respostas obtidas para uma mesma concentração, a uma série de análises, que deve variar entre 6 e 10 (EMA, 1995; Ribani *et al.*, 2004).

$$CV (\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad (7)$$

Na equação 7, S , corresponde ao desvio padrão absoluto e \bar{x} à média aritmética das medições. Deste modo, a precisão pode ser avaliada através do estudo da repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia (EMA, 1995; Ribani *et al.*, 2004).

1.5.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade corresponde à precisão de resultados obtidos por medições sucessivas, usando o mesmo método e as mesmas condições de medição (mesmo procedimento), efetuadas à mesma amostra ou padrão, num curto intervalo de tempo (mesmo dia), sobre as mesmas condições experimentais, tais como a utilização do mesmo laboratório, o mesmo operador e equipamento analítico, assim como os mesmos reagentes (RELACRE, 2000; Ribani *et al.*, 2004). Assim, para determinar a repetibilidade de um método efetuam-se uma série de medições (ex: três níveis com três repetições em cada um, ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração próxima do valor esperado), sobre uma mesma amostra ou padrão, em condições de repetibilidade, e calcula-se o CV.

Caso se justifique, o procedimento é repetido sobre uma série de amostras, em vários níveis de concentração, cobrindo todo o domínio de aplicação do método (RELACRE, 2000).

1.5.3.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade caracteriza-se como a precisão de um método utilizando o mesmo método, sobre uma mesma amostra ou padrão, efetuado em condições experimentais diferentes, isto é, intervalos de tempo diferentes (dias diferentes), diferentes laboratórios, diferentes operadores, diferentes equipamentos e diferentes reagentes (INMETRO, 2010). A reprodutibilidade é avaliada através do valor do CV dos resultados das análises repetidas nas condições anteriormente mencionadas (Ribani *et al.*, 2004).

1.5.3.3. Precisão Intermédia

A precisão intermédia é reconhecida como a mais representativa da variabilidade de resultados num laboratório e, como tal, é a mais aconselhável de usar (RELACRE, 2000; Ribani *et al.*, 2004). Esta medida expressa a precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente as condições a variar (INMETRO, 2010; RELACRE, 2000). Assim, este estudo tem como objetivo avaliar a interferência que a mudança de certas condições dentro do laboratório, como diferentes operadores, diferentes equipamentos e diferentes dias de análise, ou com uma combinação destes fatores podem ter no resultado final (RELACRE, 2000; Ribani *et al.*, 2004). A precisão intermédia é avaliada através do valor do CV dos resultados das análises repetidas nas condições anteriormente mencionadas (Ribani *et al.*, 2004).

1.5.4. Exatidão

A exatidão de um método analítico é o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro (RELACRE, 2000; Ribani *et al.*, 2004). É importante observar que um valor verdadeiro ou exato é um valor obtido por uma medição perfeita, e este valor é, por natureza, impossível de conhecer. A exatidão está condicionada pela existência de erros sistemáticos e erros aleatórios, para um dado conjunto de ensaios independentes, levando ao aparecimento de resultados significativamente afastados do seu valor verdadeiro. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método em amostras são: a comparação com um material de referência certificado, a comparação de resultados de um ou mais métodos analíticos diferentes, e a realização de ensaios de recuperação com a adição de padrão (amostras fortificadas com o analito) (Ribani *et al.*, 2004). A exatidão em padrões pode ser calculada com recurso às retas de calibração obtidas, processo denominado de *back calculation*, através da razão entre a média das concentrações reais obtidas para

um dado padrão (calculada na reta de calibração) e a concentração média teórica (concentração preparada para o mesmo padrão) de uma série de análises efetuadas (Equação 8) (RELACRE, 2000).

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Média da concentração real}}{\text{Média da concentração teórica}} \times 100 \quad (8)$$

A exatidão deverá ser avaliada através de um mínimo de nove determinações e contendo no mínimo três níveis de concentração definidos, de forma a abranger um intervalo estabelecido, por exemplo, três concentrações com três repetições de cada (Ribani *et al.*, 2004).

1.5.5. Limites de detecção e quantificação

O LOD define-se como a menor quantidade da substância a analisar que pode ser detetada com precisão e exatidão adequadas, mas não necessariamente quantificada pelo método (RELACRE, 2000; Ribani *et al.*, 2004). Qualitativamente, o LOD corresponde ao início do intervalo em que é possível distinguir o sinal do branco do sinal da amostra (presença ou ausência do analito). Ou seja, o LOD é a mais pequena quantidade de analito presente numa amostra que pode ser detetada estatisticamente, mas não tem de ser quantificada como um valor exato, e corresponde a um sinal duas a três vezes maior do que o ruído do equipamento (Ermer & Burgess, 2005; RELACRE, 2000). De salientar, que uma leitura que seja inferior ao limite de detecção não significa que o analito esteja ausente, apenas indica que a concentração do composto em causa é inferior ao LOD (RELACRE, 2000). O LOD pode ser calculado através do método visual, do método relação sinal-ruído ou pelo método baseado em parâmetros da reta de calibração. Quando o método analítico envolve a utilização da reta de calibração, o LOD é calculado através do desvio padrão da reta. Neste caso, o LOD pode ser calculado (Equação 9) tendo em conta o desvio padrão da resposta (s), que pode ser o desvio padrão do branco, da ordenada na origem da equação da reta, ou da equação da reta da regressão linear, e o declive da reta analítica (m) (Ribani *et al.*, 2004).

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{s}{m} \quad (9)$$

O LOQ de um método corresponde à menor quantidade do analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com um nível aceitável de precisão e exatidão (RELACRE, 2000; Ribani *et al.*, 2004). Este limite, após ser determinado, deve ser testado para averiguar se a precisão e exatidão obtidas são satisfatórias, recorrendo a padrões cuja concentração é próxima ou igual ao limiar de quantificação. Quando o método envolve a utilização da curva de calibração, o LOQ é calculado através da equação 10, semelhante à equação para determinar o LOD (Equação 9). O LOQ pode ser calculado utilizando os mesmos parâmetros definidos no cálculo do LOD (RELACRE, 2000).

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{s}{m} \quad (10)$$

Embora os limites estejam definidos no método, sempre que ocorrem alterações ao método, torna-se necessário proceder à atualização dos limiares analíticos (LOD e LOQ) sempre que ocorram alterações

de fatores de influência (como o analista, ambiente, reagentes, equipamento, entre outros), assim como quando se procede à elaboração de uma nova reta de calibração e se utilizam os dados da mesma para o cálculo destes limites (RELACRE, 2000).

1.5.6. Sensibilidade

A sensibilidade de um método analítico permite aferir a capacidade desse método em diferenciar pequenas quantidades do analito, e é dada pela razão entre a resposta instrumental e a concentração. Logo, se o modelo de regressão é linear, a sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao seu declive. Um método é considerado mais sensível quando é capaz de discriminar pequenas variações de concentração, e, quanto maior o declive da reta, maior a sensibilidade do método. A sensibilidade relaciona-se com a variação mínima que é necessário impor à grandeza a medir (concentração) para se obter uma variação significativa do resultado da medição (sinal). Deste modo, um método será considerado sensível se pequenas variações na concentração do analito (x) derem origem a variações no sinal medido (y) (RELACRE, 2000).

1.5.7. Robustez

A robustez de um método analítico, define-se como o grau de sensibilidade a perturbações, e representa a medida da capacidade do mesmo se manter inalterável quanto ao seu desempenho analítico perante pequenas modificações nos seus parâmetros experimentais (EMA, 1995; Ribani *et al.*, 2004). Um método diz-se robusto se for praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando este está a ser executado (RELACRE, 2000). A robustez de um método de HPLC é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como pH e força iónica da FM, a concentração do solvente orgânico, temperatura, mas também com variáveis relacionadas com o método de extração como o tempo de extração ou a agitação, entre outros. As mudanças introduzidas a nível da robustez do método refletem as possíveis alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos. Na análise por HPLC, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando o pH da FM em 0,1 unidades de pH, o conteúdo de MeOH na FM em $\pm 2\%$, ou a temperatura da coluna em $\pm 5^\circ\text{C}$ (Aragão *et al.*, 2009; Ribani *et al.*, 2004). Assim, se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e, tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (Ribani *et al.*, 2004).

2. Objetivos

Este trabalho de investigação pretende analisar alguns dos compostos fitoquímicos presentes em duas espécies de *Euphorbia*, existentes na flora portuguesa.

Neste sentido, a presente dissertação apresenta como objetivo geral otimizar e revalidar um método analítico para determinação e quantificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD, e aplicação em extratos metanólicos (EM) e extratos aquosos (EA) de *E. paralias* e *E. hirsuta*.

Como objetivos específicos pretende-se:

- Adaptar uma metodologia pré-existente de HPLC-DAD para a identificação e quantificação de compostos fenólicos, em extratos (aquoso e metanólico) de plantas do género *Euphorbia*;
- Determinar parâmetros de validação do método analítico adaptado (sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão, LOD e LOQ);
- Analisar extratos (metanólico e aquoso) de *E. paralias* e *E. hirsuta*, utilizando o método analítico referido anteriormente, em termos dos compostos fenólicos encontrados (identificação) e quantidades obtidas (quantificação).

3. Material e Métodos

O projeto teve início em Outubro de 2021 e terminou em Outubro de 2022. A componente de pesquisa bibliográfica iniciou-se em Outubro de 2021, com recurso às seguintes bases de dados: *PubMed*, *Elsevier*, *EBSCO*, *b-on* e *Ovid*, para auxiliar a componente laboratorial que foi iniciada em Fevereiro de 2022.

3.1. Material vegetal

As partes aéreas do material botânico em estudo, de *E. paralias* e *E. hirsuta*, foram recolhidas, num estudo anterior de Ribeiro *et al.* (2021), na Barrinha de Esmoriz (40°57'45.9"N|8°38'07.7"W), no distrito de Aveiro, Portugal, em Julho de 2019. Tal como descrito por Ribeiro *et al.* (2021), a identificação taxonómica das espécies foi realizada com a cooperação de especialistas da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (Ribeiro, 2021).

3.2. Preparação das amostras

Os EM e EA de *E. paralias* e *E. hirsuta* foram provenientes de um estudo anterior (Ribeiro, 2021). Resumidamente, a parte aérea das plantas secas foram sujeitas a uma extração com dois solventes, à temperatura ambiente e no escuro: metanol-água (80:20, v/v), durante 48 horas; e água, durante 24 horas. Após filtradas, as soluções extrativas foram concentradas em evaporador rotativo (VWR, IKA RV8), no caso da extração com metanol; e liofilizadas (ambas as soluções) (LABCONCO, FreeZone series) (Ribeiro, 2021).

As amostras dos extratos foram dissolvidas numa solução de FM (5% ACN, 90% água acidificada com ácido acético e 5% MeOH) e filtradas com filtro de membrana de Nylon de tamanho de poro 0,22 µm Avantor™ da VWR TM (China). Posteriormente, foram colocados, num *vial* de vidro escuro de 1,5 ml de capacidade da VWR (VWRI548-1471, lote: 887040376650) e com tampa de septo perfurável da VWR (VWRI548-1537, lote: 8000013160) cerca de 200 µL de amostra, e cada *vial* foi posicionado adequadamente no tabuleiro do amostrador automático do HPLC.

3.3. Padrões e reagentes

O desenvolvimento do método foi realizado no sentido de identificar e quantificar sete compostos fenólicos: ácido cafeico (ACF), ácido clorogénico (ACL), ácido gálico (AG), hesperidina (HESP), naringina (NARG), quercetina 3- glucósido (QUER3G) e quercetina 3-rutinósido (rutina) (RUT). No âmbito desta dissertação foram validados os compostos: AG, QUER3G e RUT (Tabela III).

Tabela III: Compostos utilizados como padrões cromatográficos, com indicação de marca, CAS, estado de pureza, massa molecular e lote.

Composto (Fórmula química)	Marca	CAS	Pureza	Massa Molecular	Lote
Ácido gálico (C ₇ H ₆ O ₅)	Merck KGaA® (Alemanha)	149-91-7	≥ 98%	170,12 g/mol	S6670749341
Quercetina 3- glucósido (C ₂₇ H ₁₉ O ₁₂)	Sigma – Aldrich® (França)	482-35-9	≥ 98% (HPLC)	464,38 g/mol	BCBW0117
Rutina (C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆)	Sigma – Aldrich® (China)	207671-50-9	≥ 94% (HPLC)	610,52 g/mol	BCBW7626

Para a preparação da FM e soluções padrão, foram usados os solventes: MeOH de grau de pureza para HPLC (≥ 99,9%), CAS 67-56-1, da marca Honeywell®, Riedel-de-Haën™ (França); ACN de grau de pureza para HPLC (≥ 99,95%), CAS 75-05-8, da marca VWR® (Fontenay-sous-Bois, França); água ultrapura obtida pelo sistema de purificação por osmose reversa Smart2Pure 3™ da Thermo Scientific™ (Langensfeld, Suécia). A água foi acidificada (0,5% v/v) com ácido acético glacial de grau de pureza analítico (≥ 99%), CAS 64-19-7, adquirido na VWR® (Fontenay-sous-Bois, França). Esta solução de ácido acético glacial foi filtrada com filtro de membranas de nylon de 0,47 mm de diâmetro e porosidade 0,22 µm, da Branchia® (Labbox Labware, S.L.). Antes da utilização em HPLC, todos os solventes da FM foram desgaseificados em banho de ultrassons, Bandelin SONOREX™ (Berlim, Alemanha), durante 30 min, à temperatura ambiente.

3.4. Preparação de soluções *stock* e soluções padrão para a reta de calibração

Numa fase inicial, de adaptação do método analítico de Irakli *et al.* (2012b), foram preparadas soluções *stock* individuais de cada padrão na concentração de 1000 µg/mL. Os compostos foram pesados rigorosamente (0,0010 g) em balança analítica KERN ALS®, e dissolvidos em 1,0 mL de MeOH. Estas soluções *stock* foram diluídas em FM na composição inicial, correspondente a água acidificada:MeOH:ACN, 90:5:5 (Tabela V) para concentrações de 500 µg/mL e 50 µg/mL, que foram usadas para os estudos preliminares dos tempos de retenção dos compostos e ajuste do método analítico à separação de todos os compostos em análise.

Após adaptação do método analítico, e por forma a elaborar a calibração e validação do mesmo para os compostos em estudo, foi preparada uma solução contendo os sete compostos fenólicos utilizados como padrões (ACF, ACL, AG, HESP, NARG, QUER3G e RUT), a qual foi designada por padrão fenólico misto (PFM). Inicialmente, os compostos foram rigorosamente pesados (0,0005 g), em balança analítica KERN ALS®, e dissolvidos em 1,5 mL de FM na composição inicial (Tabela V), originando uma solução padrão individual (SPI) e cada composto na concentração de 333,3 µg/mL. Posteriormente, foram

adicionados 100 µL de cada SPI, originando o primeiro padrão misto da calibração (PFM₁) com uma concentração de 47,61 µg/mL de cada composto. A partir da solução de PFM₁ foram realizadas diluições sucessivas para obter mais oito diferentes níveis de concentração (23,81 µg/mL; 11,90 µg/mL; 5,95 µg/mL; 2,98 µg/mL; 1,49 µg/mL; 0,74 µg/mL; 0,37 µg/mL e 0,19 µg/mL). O volume final de cada PFM foi obtido perfazendo cada nível de concentração com a FM na composição inicial (Tabela V), estando a sua composição e preparação representadas na Tabela IV. As soluções *stock* individuais, as SPI e as soluções de PFM foram armazenadas ao abrigo da luz e a temperatura entre -20°C ± 5°C.

Tabela IV: Preparação dos nove níveis de concentração das soluções de padrão fenólico misto.

Solução-padrão misto (PFM)	Concentração (µg/mL)	Solução-padrão anterior e volume a usar (µL)	Volume final de PFM _i (µL)
PFM ₁	47,61	100* (SPI)	700
PFM ₂	23,81	350 (PFM ₁)	700
PFM ₃	11,90	350 (PFM ₂)	700
PFM ₄	5,95	350 (PFM ₃)	700
PFM ₅	2,98	350 (PFM ₄)	700
PFM ₆	1,49	350 (PFM ₅)	700
PFM ₇	0,74	350 (PFM ₆)	700
PFM ₈	0,37	350 (PFM ₇)	700
PFM ₉	0,19	350 (PFM ₈)	700

* de cada solução padrão individual (SPI)

3.5. Identificação e quantificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD

Durante o desenvolvimento da metodologia analítica foram realizadas inúmeras experiências preliminares de modo a serem obtidas as condições mais adequadas e favoráveis para a separação dos compostos em análise. A metodologia utilizada foi adaptada do estudo de Irakli *et al.* (2012b), tendo em conta os objetivos propostos e os resultados obtidos durante a otimização do método. A quantificação foi realizada por HLPC - DAD pelo método do padrão externo, usando um HPLC da marca *Jasco*[®], equipado com uma bomba peristáltica (modelo *PU-4180*), um injetor automático (modelo *AS-4050*), detetor DAD (modelo *MD-4010*), e uma interface de hardware entre o PC e os componentes do sistema (modelo *LC-NetII/ADC*). Foi utilizada como FE uma coluna semi-preparativa *LiChroCART*[®] 250-4, *RP-18* (250 mm de comprimento × 4 mm de diâmetro interno; 5 µm de espessura) da *Merck*[®] (Darmstadt, Alemanha). A coluna tem funcionamento em RP e é composta por sílica com uma fase ligada de octadecilsílica (C₁₈), estando contida num forno (modelo *CO-4061*) programado para uma temperatura de 25°C (Figura 14).

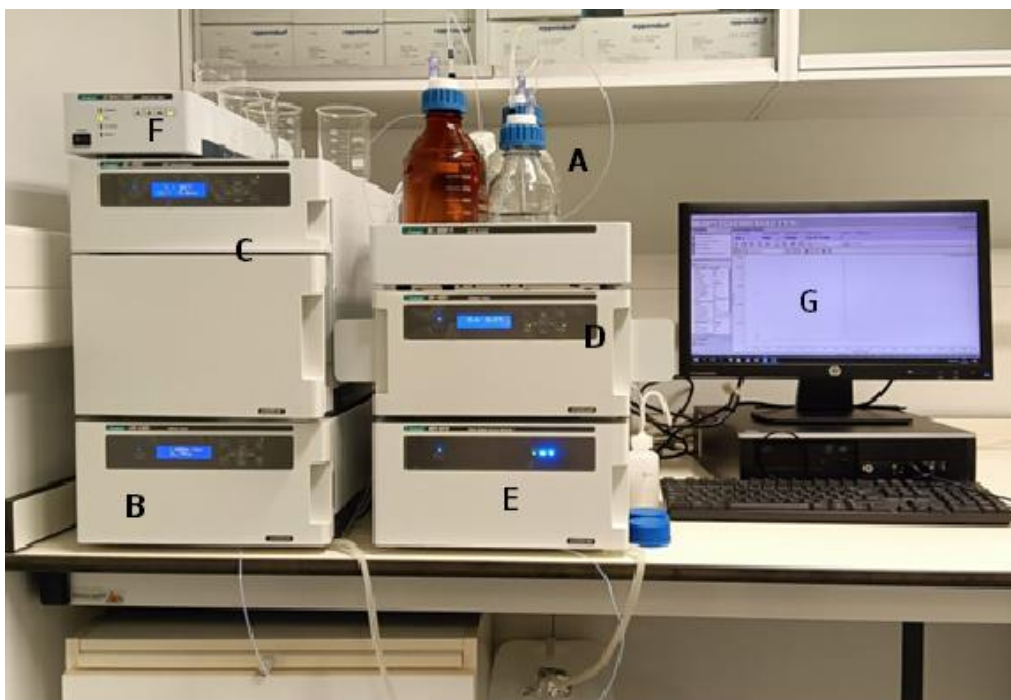


Figura 14: Equipamento de HPLC-DAD do Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), marca *Jasco*®. (A) Reservatório de recipientes com os solventes que constituem a fase móvel (modelo *BS-4000-1*); (B) Bomba peristáltica (modelo *PU-4180*); (C) Injetor automático (modelo *AS-4050*); (D) Forno (modelo *CO-4061*) com coluna cromatográfica; (E) Detetor de fotodíodos (modelo *MD-4010*); (F) Interface entre o computador e os componentes do sistema (modelo *LC-NetII/ADC*); (G) Computador para aquisição e processamento de dados.

A FM foi composta por MeOH (A), ACN (B) e água acidificada com ácido acético 0,5% (v/v) (C), previamente filtrada. Todos os solventes foram colocados em banho de ultrassons, durante 30 min, sem temperatura, antes de serem colocados no HPLC.

O gradiente de eluição selecionado para análise consistiu num gradiente de sete etapas (Tabela V): a composição inicial da FM foi de 5% do componente A, 5% do componente B e 90% do componente C, seguido durante 5 min num gradiente linear até 10% de A, 5% de B e 85% de C; entre os 5 e os 30 min, mantém 10% de A e chega até 10% de B e 80% C; dos 30 aos 38 min passa, linearmente, a ter só 30% B e 70% C; entre 38 e 50 min, volta a ter uma mudança linear dos componentes B (para 60%) e C (para 40%), voltando às condições iniciais da corrida aos 55 min, e mantendo-se assim até aos 60 min.

As análises foram realizadas a uma taxa de fluxo de 1,000 mL/min e o volume de injeção foi de 20 μ L. A deteção foi realizada com detetor DAD que permitiu monitorizar todos os comprimentos de onda simultaneamente (190–450 nm). A aquisição de dados correspondente aos compostos de interesse foi registada nos comprimentos de onda de 280, 320, 350, e 360 nm e transmitido ao software *ChromNev*® onde as áreas dos picos foram integradas de forma manual e sempre pelo mesmo operador.

Tabela V: Gradiente de eluição da fase móvel utilizado no sistema cromatográfico para a análise dos compostos fenólicos.

Tempo (min)	Percentagem de solvente (%)		
	Metanol (A)	ACN (B)	Água acidificada com ácido acético 0,5% (v/v) (C)
0	5	5	90
5	10	5	85
30	10	10	80
38	0	30	70
50	0	60	40
55	5	5	90
60	5	5	90

3.6. Análise estatística e validação do método

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada por comparação das áreas dos picos registadas a 280, 320, 350 e 360 nm, tendo-se escolhido, para cada composto, o comprimento de onda para o qual o sinal correspondente apresentava maior intensidade (área do pico). Posteriormente, definiram-se as respetivas retas de calibração para cada composto, usando a equação 6, descrita anteriormente, e os PFM, descritos na secção 3.4.

Neste estudo analisaram-se sete compostos: ACF, ACL, AG, HESP, NARG, QUER3G e RUT. No entanto, apenas três foram analisados em termos de parâmetros de validação: AG, QUER3G e RUT. Os parâmetros dos restantes quatro compostos foram determinados por outros membros da mesma equipa de investigação, mas não serão explorados no âmbito do presente estudo.

O método analítico foi validado para os seguintes parâmetros analíticos: sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão, LOD e LOQ. Para determinação dos parâmetros sensibilidade e linearidade, utilizaram-se as definições do m e do R da reta, descritas na secção 1.5.2. Na calibração, em cada nível de concentração, foram realizados entre três a seis ensaios. Este número de repetições permitiu avaliar a precisão e a exatidão em padrões. Assim, para a precisão e exatidão foram usadas várias soluções dos PFM, em vários níveis de concentração. No caso da precisão utilizou-se a equação 7 e as definições descritas na secção 1.5.3., enquanto para a exatidão foi feito um cálculo retroativo (*back calculation*) (equação 8), descrito na secção 1.5.4 com recurso às retas de calibração obtidas. Os LOD e LOQ foram calculados segundo as equações 9 e 10, descritas na secção 1.5.5.

Na análise de dados utilizaram-se o *software* ChromNev® (software do equipamento de HPLC) e, posteriormente, o *software* Microsoft Excel®.

4. Resultados e Discussão

4.1. Otimização do método analítico

Antes da implementação do método realizaram-se vários estudos prévios, bem como várias pesquisas bibliográficas para a obtenção de informações sobre métodos já desenvolvidos para os compostos fenólicos e para plantas do género *Euphorbia* (Tabela II). Relativamente às metodologias já desenvolvidas para espécies de *Euphorbia* verificou-se uma escassez de informação nas bases de dados, pois a maioria dos estudos concentram-se na análise de terpenos, e poucos fazem referência a compostos fenólicos, sendo os métodos de quantificação de compostos fenólicos existentes, para as espécies *E. paralias* e *E. hirsuta*, referentes a HPLC com detecção RMN ou MS (Tabela II). A HPLC, foi também a metodologia analítica adoptada no presente estudo, neste caso, associada a DAD, com uma fase estacionária de C₁₈, funcionamento em gradiente e fase reversa. A coluna semi-preparativa C₁₈ do tipo fase-reversa *LiChroCART® 250-4, RP-18* (250 mm × 4 mm × 5 µm) utilizada teve influencia nos resultados obtidos, pois, o comprimento da coluna e o tamanho das partículas que constituem a FE podem ter influenciado o comportamento cromatográfico da FE (Harris, 2007). No entanto, a utilização de uma coluna de maior comprimento e com menor tamanho de partículas poderia ter obtido uma melhor resolução durante a análise por HPLC (Harris, 2007; Pinto, 2011). O equipamento usado, que foi adquirido recentemente e com software muito atual, permitiram tratar os resultados de uma forma mais expedita. A automatização do processo cromatográfico, com a utilização de um injetor automático controlado pelo computador, permite a análise de várias amostras em sequência e sem a presença do operador, contribuindo para a repetibilidade e reprodutibilidade (maior precisão) e diminuindo a possibilidade de contaminações (Pinto, 2011). Para além disso, essa automatização foi bastante útil pois permitiu a análise de um número elevado de amostras, principalmente durante o processo de calibração.

Durante o desenvolvimento do método, foram testadas duas metodologias diferentes. No entanto, em ambas a proporção do componente aquoso no gradiente da FM foi diminuindo ao longo da análise, e aumentando a proporção do componente orgânico. Durante a análise utilizaram-se solventes com grau de pureza para HPLC para dessa forma evitar a degradação da coluna com impurezas e para minimizar os sinais de fundo do detetor (Harris, 2007). Na primeira metodologia foi utilizada como FM uma mistura entre MeOH e água acidificada com 5% (v/v) de CH₂O₂, com eluição à temperatura ambiente (Dias *et al.*, 1999). Posteriormente, a metodologia foi adaptada de Irakli *et al.* (2012b), operando a uma temperatura constante de 25°C e introduzindo um novo componente na FM, o ACN, tendo em conta os objetivos na análise cromatográfica e os resultados obtidos durante a otimização do método. Após alguns testes, optou por utilizar-se esta FM, composta por ACN, MeOH e água acidificada com ácido acético 0,5% (v/v), já que permitiu uma melhor resolução dos picos e separação dos analitos, em comparação com a metodologia inicialmente testada. Além disso, a utilização do forno e a manutenção da temperatura do mesmo a 25°C foi a opção seleccionada para a análise, pois verificou-se melhor resolução dos picos, em

comparação com a primeira FM testada, com funcionamento à temperatura ambiente, que não permitiu a separação de alguns dos compostos. De fato, quando a temperatura da coluna não é controlada, ela oscila com a temperatura ambiente, e portanto, a utilização de um forno de coluna ajustado, melhora a reprodutibilidade dos tempos de retenção e a precisão da análise quantitativa (Harris, 2007). Relativamente ao fluxo utilizado, de 1,000 mL/min, permitiu uma boa separação cromatográfica dos compostos a uma pressão e tempo de análise relativamente baixos, não sendo necessários ajustes a este nível, em relação ao método original.

A preparação das soluções *stock* de padrões foi também uma das fases de estudo. A sua preparação teve em conta a solubilidade descrita na literatura para cada padrão fenólico, e foi utilizado como solvente a FM de HPLC na composição inicial (água acidificada:MeOH:ACN, 90:5:5), o que evita choques entre a composição dos padrões e a FM.

Após análise dos padrões, nesta fase de otimização do método analítico, ficaram definidos os t_R de cada composto, bem como o comprimento de onda ideal de cada um dos picos correspondentes aos compostos de interesse. Para isso, os composto fenólicos utilizados como padrões foram identificados injetando cada um deles, separadamente e sob as mesmas condições, e registado o t_R dos respetivos picos cromatográficos. Assim que se obtiveram t_R distintos para cada composto, preparou-se um PFM de forma a que o método analítico detetasse vários compostos em simultâneo, o que permitiu uma poupança de tempo na validação do método analítico e uma maior proximidade com as condições reais das amostras. Os t_R dos compostos em análise foram obtidos através da comparação dos cromatogramas do PFM (Figura 15.a; Figura 15.b e Figura 15.c) com os cromatogramas dos padrões individuais anteriormente analisados nas mesmas condições. O detetor *PDA MD-4010* usado apresenta alta sensibilidade de deteção na faixa de comprimento de onda entre 190 nm a 900 nm, o que permite que as regiões UV e visível sejam monitorizadas simultaneamente (JASCO, *s.d.*; Yao *et al.*, 2004). O espectro de cada padrão foi analisado e armazenado no sistema informático, e o software ChromNev[®] permitiu analisar cada cromatograma em comprimentos de onda discretos, com variação de 1 nm (JASCO, *s.d.*). Assim, para cada um dos compostos fenólicos em estudo, foi selecionado o comprimento de onda no qual a intensidade do sinal cromatográfico (área do pico) era maior. A melhor absorção foi detetada nos comprimentos de onda de 280 para o AG e 350 nm para a QUE3G e RUT. Noutros estudos descritos na literatura, de análise de compostos fenólicos presentes em amostras similares, foram testados vários comprimentos de onda (230, 250, 280, 320, 350, 380, 450 e 510 nm) onde se incluem os usados no presente trabalho (Ghani *et al.*, 2020; Irakli *et al.*, 2012b; Yao *et al.*, 2004). Os comprimentos de onda de deteção dos compostos analisados são também muito próximos aos referidos no estudo de Yao *et al.* (2004), para os compostos AG e QUER3G. No entanto, para a RUT o comprimento de onda de deteção difere no analisado por Skendi *et al.* (2017), no qual a intensidade no sinal foi maior a 260 nm.

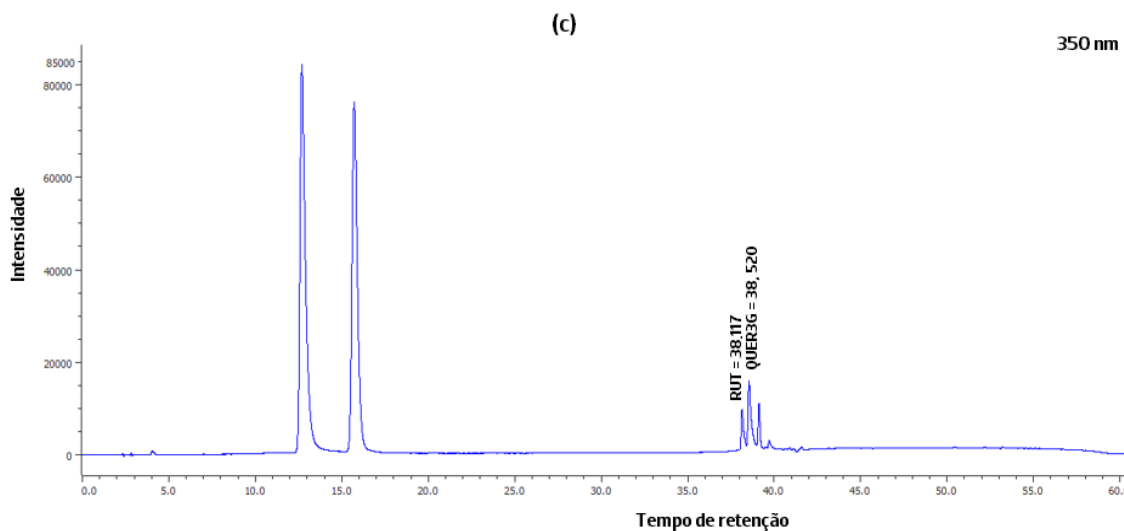
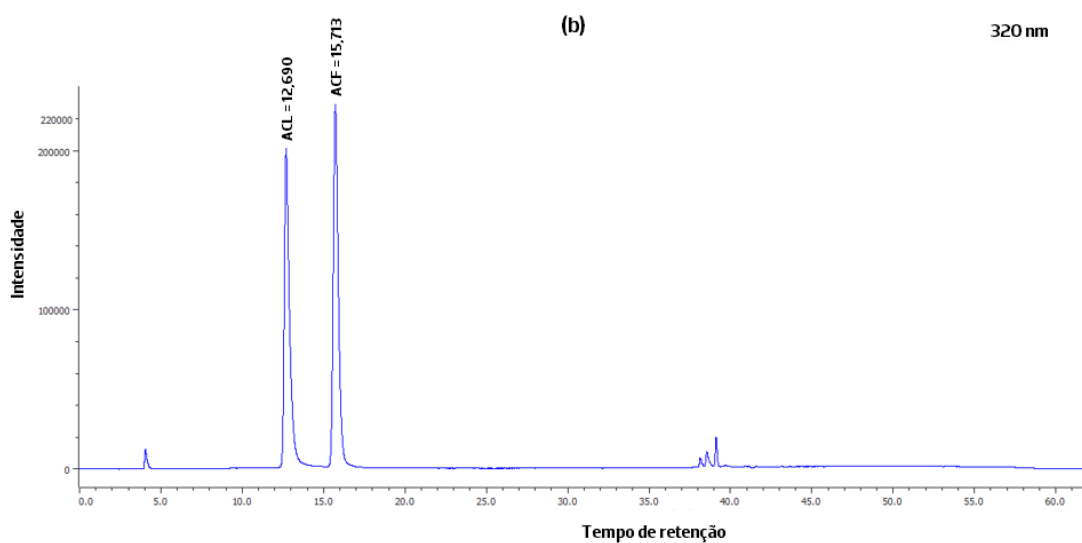
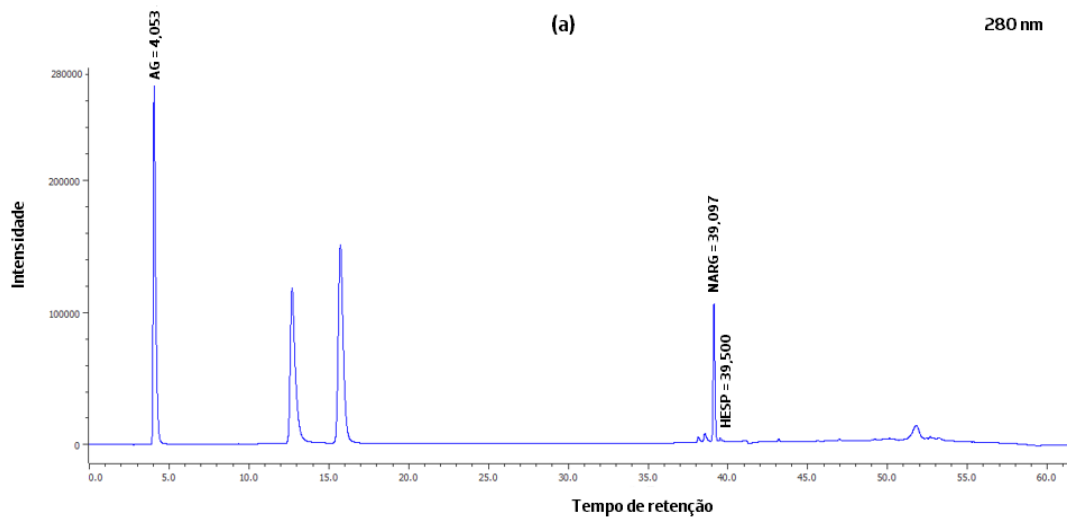


Figura 15: Perfil cromatográfico obtido a 280 nm (a); 320 nm (b) e 350 nm (c) da solução de PFM e descrição dos respectivos tempos de retenção dos compostos: AG ($t_R = 4,053$ min), ACL ($t_R = 12,690$ min), ACF ($t_R = 15,713$ min), RUT ($t_R = 38,117$ min), QUE3G ($t_R = 38,520$ min), NARG ($t_R = 39,097$ min), HESP ($t_R = 39,500$ min).

Como se pode observar na Figura 15, a injeção de PFM originou tempos de retenção distintos para todos os compostos detetados com este método analítico. Analisando os t_R e largura dos picos de todos os compostos fenólicos, percebe-se que o método analítico conseguiu uma boa resolução cromatográfica, sem qualquer sobreposição de picos. No que diz respeito aos compostos validados no presente estudo, AG, QUE3G e RUT, os t_R médios obtidos na calibração, bem como os comprimentos de onda escolhidos, encontram-se descritos na Tabela VI.

Tabela VI: Dados analíticos para o método de HPLC para os compostos fenólicos utilizados como padrão e seus respectivos comprimento de onda de detecção e tempo de retenção.

Composto	Tempo de retenção, t_R (min)	Comprimento de onda, λ (nm)
AG	3,976	280
RUT	37,995	350
QUER3G	38,373	350

4.2. Validação de método analítico

Relativamente à validação do método analítico por HPLC-DAD para identificação e quantificação dos compostos AG, QUER3G e RUT, foram considerados os seguintes parâmetros: sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão, LOD e LOQ.

a. Linearidade e sensibilidade

A linearidade do método foi analisada por regressão linear, através do coeficiente de correlação, R , da reta de calibração para cada padrão em vários níveis de concentração. Para tal, foi relacionada a área do pico cromatográfico e a concentração de cada analito. Na construção da reta de calibração foram utilizadas as seguintes concentrações de PFM 0,37 $\mu\text{g/mL}$; 0,74 $\mu\text{g/mL}$; 1,49 $\mu\text{g/mL}$; 2,98 $\mu\text{g/mL}$; 5,95 $\mu\text{g/mL}$; 11,90 $\mu\text{g/mL}$, 23,81 $\mu\text{g/mL}$ e 47,61 $\mu\text{g/mL}$ para o AG e para a RUT e as concentrações de 2,98 $\mu\text{g/mL}$; 5,95 $\mu\text{g/mL}$; 11,90 $\mu\text{g/mL}$, 23,81 $\mu\text{g/mL}$ e 47,61 $\mu\text{g/mL}$ para a QUER3G. Nas figuras seguintes, encontram-se representadas as retas de calibração, respetivas equações da reta e valores de coeficiente de determinação (R^2) do AG (Figura 16), da RUT (Figura 17) e da QUER3G (Figura 18).

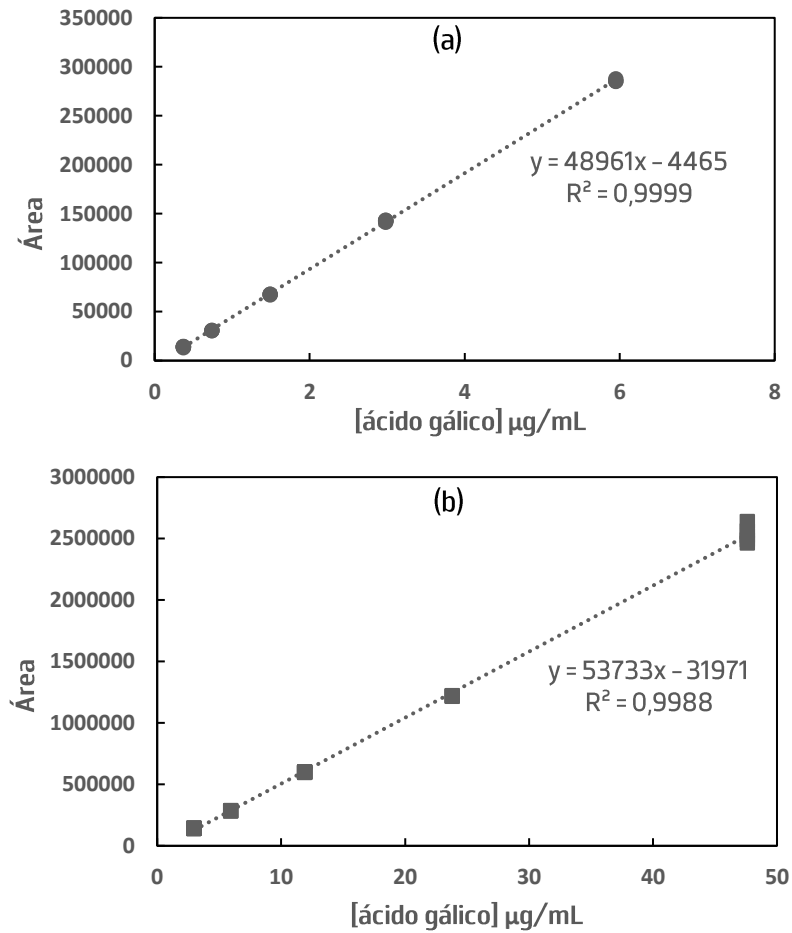


Figura 16: Retas de calibração do ácido gálico na gama de concentrações de 0,37 a 5,95 µg/mL(a) e 2,98 a 47,61 µg/mL(b).

No caso das calibrações para os compostos AG (Figura 16) e RUT (Figura 17) a gama de linearidade total teve de ser dividida em duas gamas: cinco concentrações mais baixas, de 0,37 a 5,95 µg/mL (que correspondem às figuras 16.a e 17.a), e cinco concentrações mais elevadas, de 2,98 a 47,61 µg/mL (que correspondem às figuras 16.b e 17.b). Isto teve de ser feito porque o traçado de uma única reta de calibração para a gama completa de calibrações consideradas, não originava parâmetros de linearidade adequados, como os LOD e LOQ, que analisaremos posteriormente. A linearidade do método, verificada através do estudo das retas de calibração, foi comprovada para ambos os compostos, tanto para valores de concentração mais baixos como para valores de concentrações mais elevados.

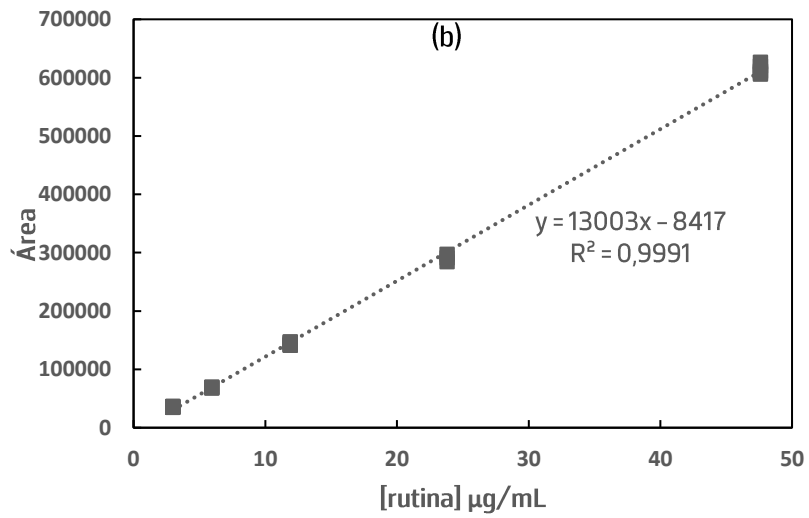
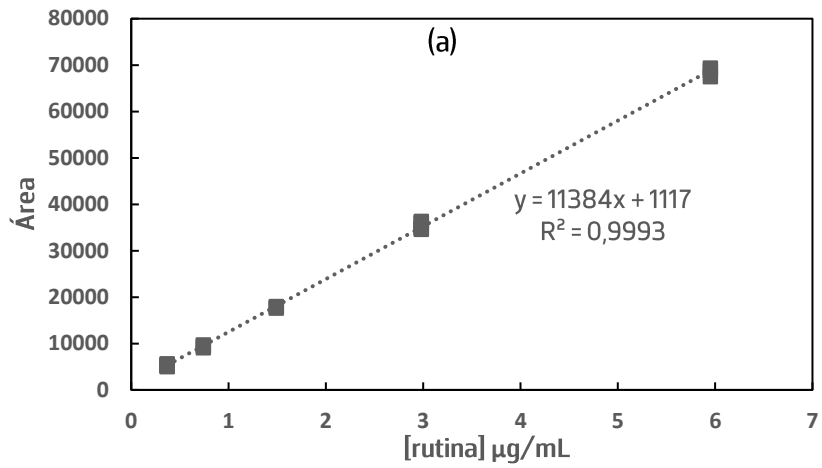


Figura 17: Retas de calibração da rutina na gama de concentrações de 0,37 a 5,95 µg/mL (a) e 2,98 a 47,61 µg/mL (b).

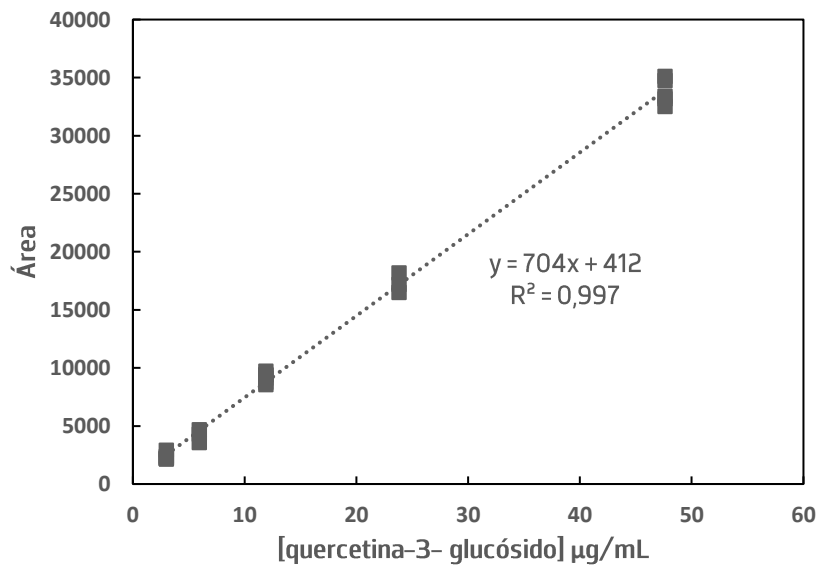


Figura 18: Retas de calibração da quercetina-3-glucósido na gama de concentrações de 2,98 a 47,61 µg/mL.

No entanto para a QUER3G só foram alcançados valores de linearidade, nas cinco concentrações mais elevadas, ou seja, na gama de concentrações mais elevadas, de 2,98 a 47,61 µg/mL (Figura 18).

A Tabela VII resume os resultados de linearidade obtidos para os três padrões fenólicos utilizados no método analítico por HPLC-DAD deste estudo.

Tabela VII: Dados analíticos para o método de HPLC para os compostos fenólicos utilizados como padrão e respectivas faixas de linearidade e critérios de linearidade tendo em conta o declive (m), o desvio padrão do declive (s_m), a ordenada na origem (b), o desvio padrão da ordenada na origem (s_b) e o coeficiente de correlação (R).

Composto	Faixa de linearidade (µg/mL)	Erro relativo					
		m	s_m	do declive (%)	b	s_b	R
AG	0,37 - 5,95	48961	129	0,3	- 4465	365	0,9999
	2,98 - 47,61	53733	410	0,8	-31971	10137	0,9993
RUT	0,37 - 5,95	11384	69	0,6	1117	197	0,9996
	2,98 - 47,61	13003	85	0,7	- 8417	2107	0,9995
QUER3G	2,98 - 47,61	704	8	1,2	412	210	0,9985

Os valores do coeficiente de correlação, R , foram superiores a 0,999 para todos os compostos (Tabela VII), nas gamas de concentração mais elevadas e mais baixas, o que são bons indicadores de linearidade (Ribani *et al.*, 2004). Para além deste, verificou-se que outro critério de linearidade aplicado está em conformidade com o descrito nas diretrizes internacionais, nomeadamente o valor do erro relativo do declive, que foi inferior a 5% (Tabela VII) para os três compostos analisados (ICH, 2005; Ribani *et al.* 2004). Para além dos pontos anteriores, a linearidade foi também avaliada quanto ao desvio da ordenada na origem, uma vez que se considera que a reta de calibração tem uma boa linearidade se a ordenada na origem contiver o zero, ou seja $(b - s_b) < 0 < (b + s_b)$ (ICH, 2005; Ribani *et al.* 2004). No entanto, este parâmetro de linearidade não foi verificado (Tabela VII).

Relativamente à sensibilidade do método, avaliada pelo declive da reta de calibração, verificou-se que, para o AG e para a RUT, o método é mais sensível nas concentrações mais elevadas (maior declive) do que nas concentrações mais baixas. No entanto, não são muito diferentes, uma vez que a ordem de grandeza é a mesma dentro de cada composto. Para a QUER3G, o método foi o menos sensível dos três compostos analisados, sendo o AG o que apresenta maior sensibilidade de todos.

b. Limites de deteção e de quantificação

Os valores de LOD e LOQ para os três compostos em análise estão apresentados na Tabela VIII.

Tabela VIII: Valores de LOD e LOQ para os compostos AG, RUT e QUER3G.

Composto	LOD($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LOQ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
AG	0,07	0,23
RUT	0,15	0,44
QUER3G	-	2,98

Os LOD e LOQ para o AG e a RUT, foram calculados com base nas equações 9 e 10, e nas diretrizes da *ICH Expert Working Group* (ICH, 2005). O método possui um LOD de 0,07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e um LOQ de 0,23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o AG e um de LOD 0,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e LOQ de 0,44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a RUT. Os valores de LOQ para o AG e para a RUT são próximos do padrão de concentração mais baixo utilizado na calibração (0,37 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pelo que a gama de calibração escolhida é adequada, sendo possível quantificar de forma confiável a partir dessa concentração obtida. No entanto, no caso da QUER3G, a aplicação das referidas equações originou valores bastante acima da concentração do padrão de menor concentração (LOD de 3,19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e LOQ de 9,71 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o que não permitiria utilizar toda a gama de linearidade para a quantificação deste composto. Assim, assumiu-se como valor mínimo quantificável, o valor da concentração do padrão mais baixo utilizado na obtenção da reta de calibração (2,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$), uma vez que a maioria dos critérios de linearidade foram cumpridos nesta gama. De qualquer forma, o procedimento adequado seria ter realizado uma nova calibração para a QUER3G começando nos padrões de 5,95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou 11,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$, acrescentando depois padrões de concentração superior a 47,61 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de forma a ter, pelo menos, cinco padrões na gama de calibração. Como tal, e para futuras investigações, seria recomendado a utilização de concentrações superiores, ou seja, testar uma nova faixa de linearidade para a QUER3G, a fim de obter um valor de LOQ no limite inferior da gama de linearidade. De qualquer forma, estes valores estão de acordo com a sensibilidade do método para cada um dos compostos, já que o composto com menor sensibilidade, a QUER3G, tem maior LOD, e o mais sensível, o AG, apresenta o menor LOD.

Estes valores de LOD e LOQ para o AG são próximos dos encontrados por Canas *et al.* (2015) (LOD = 0,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$; LOQ = 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Vu *et al.* (2018) (LOD = 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$; LOQ = 0,21 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No entanto, são superiores aos valores encontrados para o AG por Bursal *et al.* (2013) (LOD = 0,0001 $\mu\text{g}/\text{mL}$; LOQ = 0,0004 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para a RUT este método apresenta melhores limiares analíticos comparativamente ao estudo efetuado por VU *et al.* (2018) (LOD = 0,21 $\mu\text{g}/\text{mL}$; LOQ = 4,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Bursal *et al.*, 2013; Canas *et al.*, 2015; Vu *et al.*, 2018). Contudo, os valores para o AG (LOD = 0,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$; LOQ = 0,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e para a RUT (LOD = 0,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$; LOQ = 0,13 $\mu\text{g}/\text{mL}$), foram superiores aos encontrados para estes compostos fenólicos em plantas da família Lamiaceae (Skendi *et al.*, 2017). Quanto à QUER3G, no estudo de Vu *et al.* (2018), os limites de deteção e quantificação foram superiores (LOD = 0,18 $\mu\text{g}/\text{mL}$; LOQ = 3,54 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o que mais uma vez mostra a dificuldade em ter sensibilidade para este composto.

c. Exatidão e precisão em padrões

A precisão foi calculada através da equação 9, para todos os padrões de AG, RUT e QUER3G, dentro das faixas de linearidade definidas, e os resultados representados pelo seu CV (Tabela IX). Tal como para a precisão, a exatidão foi calculada para todos os padrões e para cada nível de concentração, por *back-calculation* (secção 3.6), e os resultados são apresentados em valores percentuais (Tabela IX).

Tabela IX: Dados analíticos de precisão e exatidão para o método de HPLC para os compostos AG, RUT e QUER3G para os diferentes níveis de concentração.

Composto	Faixa de linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Coefficiente de variação, CV (%)	Exatidão (%)
AG	0,37 - 5,95	0,37	2,3	101,9
		2,98	0,5	100,7
		2,98	0,4	109,0
	2,98 - 47,61	11,90	0,3	98,8
		47,61	2,7	100,4
		47,61	5,9	99,2
RUT	0,37 - 5,95	0,37	5,9	99,2
		2,98	2,2	101,2
		2,98	1,7	113,2
	2,98 - 47,61	11,90	1,7	98,3
		47,61	1,3	100,6
		47,61	14,7	92,8
QUER3G	2,98 - 47,61	2,98	14,7	92,8
		11,90	5,0	104,6
		47,61	3,3	99,7

Obtiveram-se resultados para a precisão e para a exatidão em três (para a QUER3G) ou cinco (para o AG e a RUT) níveis de concentração, correspondentes aos níveis onde foram efetuadas seis injeções de cada padrão, dentro das gamas de linearidade de cada composto. O valor mais baixo de precisão, que corresponde ao maior CV, para o AG foi na concentração de 47,61 $\mu\text{g/mL}$, e o mais elevado corresponde à concentração de 11,90 $\mu\text{g/mL}$. Este não é o perfil esperado uma vez que a precisão deveria aumentar com a concentração, tal como se verificou para a QUER3G e para a RUT: a menor precisão obteve-se para a menor concentração (2,98 $\mu\text{g/mL}$ e 0,37 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente para a QUER3G e RUT), e a maior precisão obteve-se para a maior concentração (47,61 $\mu\text{g/mL}$ para ambos os compostos). No entanto, estes dois compostos, sobretudo a QUER3G, apresentam uma menor precisão do que o AG. Os valores do CV foram todos menores do que 15%, o que está de acordo com a literatura disponível (RELACRE, 2000; Ribani *et al.*, 2004).

Todos os compostos apresentam ótima exatidão, variando entre 92,8 e 113,2%, e valores encontram-se entre 50 e 120%, o que está de acordo com o descrito na literatura (Ribani *et al.*, 2004).

4.3. Resultados das amostras de EM e EA de *E. paralias* e *E. hirsuta*

As partes aéreas do material botânico em estudo de *E. paralias* e *E. hirsuta* foram quimicamente caracterizadas quanto ao seu conteúdo em alguns compostos fenólicos biologicamente ativos, nomeadamente os ácidos fenólicos (ACF, ACL, AG) e flavonóides analisados por este método analítico (HESP, QUER3G e RUT). Nas figuras 19, 20, 21 e 22 estão representados exemplos de cromatogramas das amostras de EM e EA de *E. paralias* e do EM e EA de *E. hirsuta*, respetivamente.

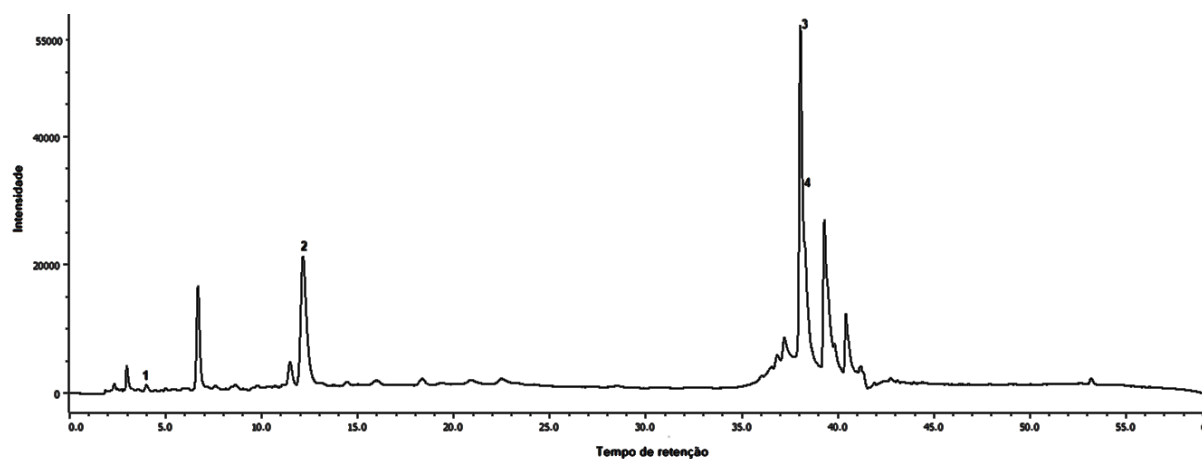


Figura 19: Perfil cromatográfico obtido a 320 nm para o EM de *E. paralias* (1 mg extrato/mL) e identificação dos compostos fenólicos 1 (AG), 2 (ACL), 3 (RUT) e 4 (QUER3G).

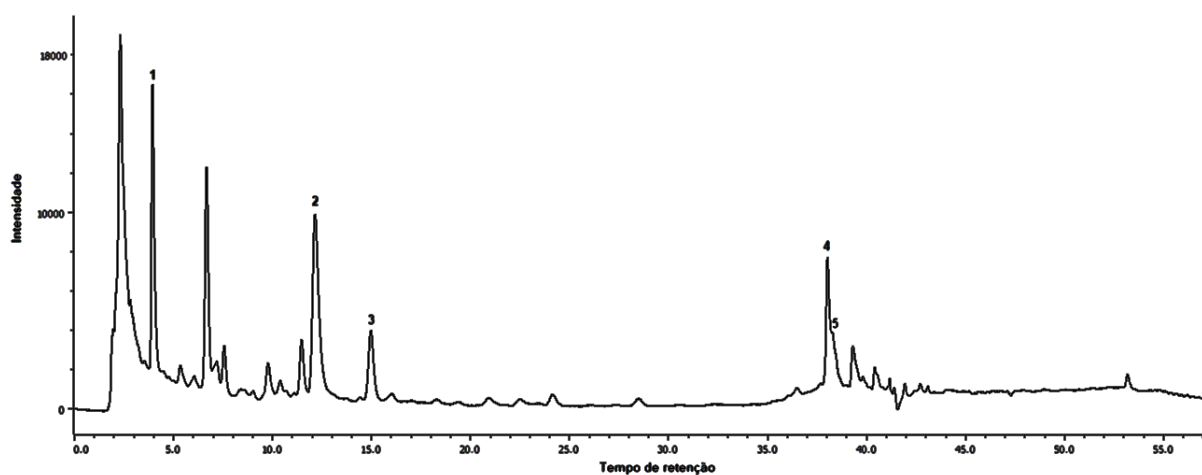


Figura 20: Perfil cromatográfico obtido a 320 nm para o EA de *E. paralias* (1 mg extrato/mL) e identificação dos compostos fenólicos 1 (AG), 2 (ACL), 3 (ACF), 4 (QUER3G) e 5 (RUT).

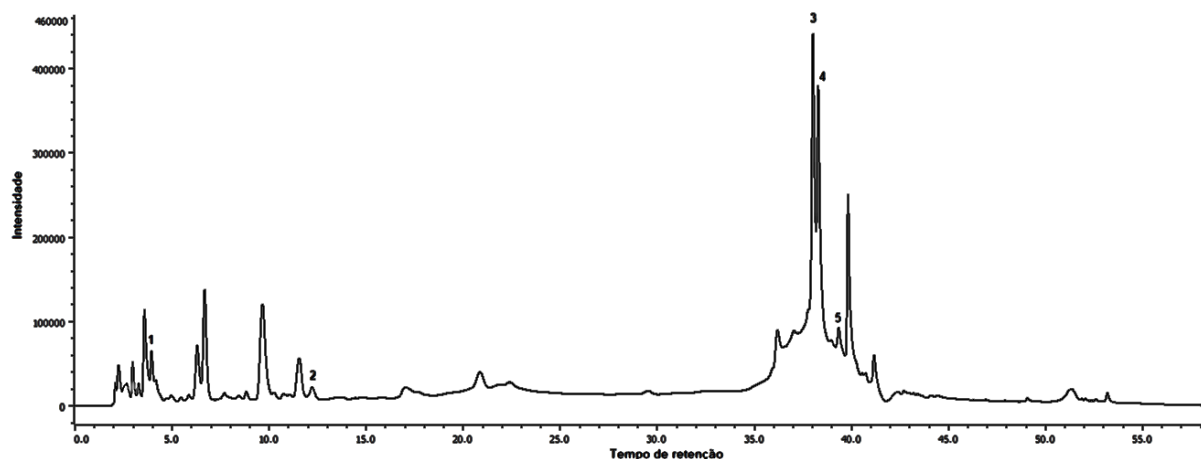


Figura 21: Perfil cromatográfico obtido a 280 nm para o EM de *E. hirsuta* (1 mg extrato/mL) e identificação dos compostos fenólicos 1 (AG), 2 (ACL), 3 (QUER3G), 4 (RUT) e 5 (HESP).

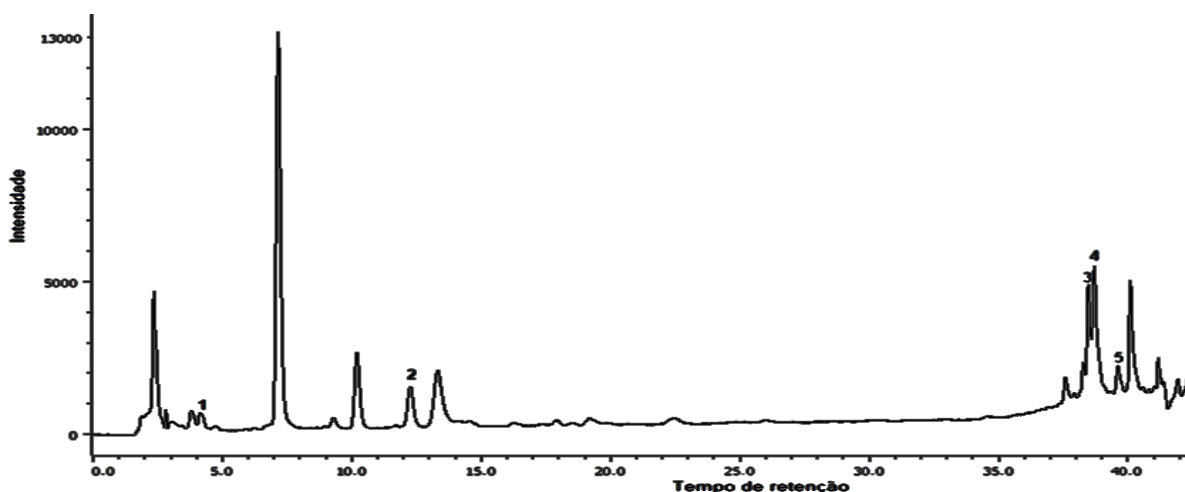


Figura 22: Perfil cromatográfico obtido a 320 nm para o EA de *E. hirsuta* na (0,5 mg extrato/mL) e identificação dos compostos fenólicos 1 (AG), 2 (ACL), 3 (QUER3G), 4 (RUT) e 5 (HESP).

A análise dos cromatogramas obtidos permitiu a deteção e/ou a quantificação dos compostos de interesse. Para os compostos AG, QUER3G e RUT foram usadas as retas de calibração já apresentadas anteriormente (Figuras 16, 17 e 18). Para os compostos cuja validação foi efetuada por outros membros da equipa de investigação, apresentam-se apenas as retas de calibração e respetivos LOQ, usadas na quantificação desses compostos: ACF ($y = 144384x - 58049$; $y = 135021x - 8261$; LOQ: 0,17 $\mu\text{g/mL}$); ACL ($y = 72538x - 62646$; $y = 63364x - 7894$; LOQ: 0,38 $\mu\text{g/mL}$); HESP ($y = 710x - 239$; LOQ: 2,98 $\mu\text{g/mL}$); NARG ($y = 17503x - 6235$; $y = 15938x + 2088$; LOQ: 2,29 $\mu\text{g/mL}$). Na tabela X estão representados os compostos fenólicos presentes nas amostras em estudo, e a quantificação de cada composto é apresentada em $\mu\text{g/g}$ de peso seco de extrato. Convém salientar que estes dados resultam apenas de uma única análise destes extratos, pelo que são considerados resultados preliminares.

Tabela X: Caracterização de compostos fenólicos nos extratos de *E. paralias* e *E. hirsuta* por HPLC-DAD.

Composto	<i>E.paralias</i>		<i>E.hirsuta</i>	
	EM ($\mu\text{g/g}$)	EA ($\mu\text{g/g}$)	EM ($\mu\text{g/g}$)	EA ($\mu\text{g/g}$)
AG	D ⁻	27440	D ⁻	5180
ACL	D ⁻	740	D ⁻	880
ACF	ND	460	ND	ND
RUT	D ⁻	D ⁻	D ⁻	D ⁻
QUER3G	D ⁺	19980	D ⁺	D ⁺
NARG	ND	ND	ND	ND
HESP	ND	ND	D ⁻	D ⁻

D⁺: detetado mas não quantificado – concentrações acima da concentração mais elevada da gama de linearidade obtida para o composto

D⁻: detetado mas não quantificado – concentrações abaixo da gama de linearidade obtida e do LOQ para o composto.

ND: não detetado

Assim, através do método validado, não se conseguiu quantificar nenhum composto nos EM de ambas as plantas, mas foi possível identificar AG, ACL, RUT e QUER3G, e também HESP apenas nos extratos de *E. hirsuta*. A maioria dos compostos identificados não se encontravam dentro dos valores utilizados na calibração do método, pois estavam abaixo da gama de linearidade obtida e do LOQ, sendo necessário injetar novamente usando menores diluições. Em ambos os extratos das duas espécies, não foi possível detetar NARG. A HESP apenas foi detetada nos extratos de *E. hirsuta*. No EA de *E. paralias*, quantificaram-se os compostos AG (27440 $\mu\text{g/g}$), ACL (740 $\mu\text{g/g}$), ACF (460 $\mu\text{g/g}$) e QUER3G (19980 $\mu\text{g/g}$). Quanto ao composto RUT não foi possível a sua quantificação pois os seus valores de concentração estavam abaixo da gama de linearidade obtida e do LOQ, sendo aconselhável injetar estas amostras em menores diluições. O mesmo se passou para a HESP no EM de *E. hirsuta*, onde também não se detetou ACF. No entanto, no EA de *E. hirsuta* foram quantificados os ácidos: AG (5180 $\mu\text{g/g}$) e ACL (8800 $\mu\text{g/g}$). Esta caracterização química preliminar através da análise de HPLC-DAD revelou a presença de dois ácidos fenólicos (AG e ACL) e dois flavonóides (RUT e QUER3G) em todas as amostras analisadas. O presente estudo vem confirmar os resultados do *screening* fitoquímico efetuado por Ribeiro (2021) ao EM e EA liofilizado de *E. paralias* e *E. hirsuta*, os quais revelaram a presença de compostos fenólicos, nas duas espécies do género *Euphorbia* analisadas, além da presença de polifenóis, flavonóides e taninos. A comparação com a literatura é difícil, pois os estudos anteriores concentraram-se em diferentes classes de compostos fenólicos nas espécies *E. paralias* e *E. hirsuta*. O estudo de Zhang *et al.* (2017) refere a existência dos compostos QUER3G e RUT em *E. lathyris*, sendo que, nesse estudo são quantificados os compostos, AG e ACL. Os valores para *E. paralias* são idênticos aos quantificados para o AG no estudo de Zhang *et al.* (2017). Já no EA de *E. hirsuta* o seu conteúdo é menor, e quanto ao ACL, o conteúdo em *E. paralias* e *E. hirsuta* foi inferior ao quantificado em *E. lathyris* (Zhang *et al.*, 2017). Tal como refere Yao *et al.* (2004), o tipo de solvente, o tempo de extração e o método

de extração são considerados importantes no desenvolvimento do protocolo de extração antes da análise da composição. No que se refere aos resultados obtidos, as amostras de EM e EA apresentam um perfil de compostos fenólicos muito idêntico, à exceção do composto ACF que estava presente no EA e não no EM de *E. paralias*. Os dois solventes, metanol e água, foram eficientes na extração de compostos fenólicos, parecendo até que os EA funcionaram melhor, e portanto, a utilização de água como solvente seria mais vantajosa, do ponto de vista da Química Verde. Esta informação é contrária à apresentada por Kecal *et al.* (2022), que refere que a água não é tão eficiente na extração de polifenóis em comparação com o MeOH e outros solventes orgânicos.

Özbilgin *et al.* (2018), referiram na sua investigação, que as espécies de *Euphorbia* são ricas em flavonóides e vários tipos de glicósidos de quercetina, os quais, foram isolados das partes aéreas de *E. characia*. Estes resultados preliminares em espécies *E. paralias* e *E. hirsuta*, parecem comprovar esse fato. No entanto, torna-se necessário a realização de mais estudos sobre estas espécies da flora portuguesa.

5. Conclusão

O presente trabalho descreve um método de HPLC-DAD adequado, simples, reprodutível e preciso para análise simultânea de AG, QUER3G e RUT de *E. paralias* e *E. hirsuta*. A metodologia foi validada com sucesso quanto a linearidade, sensibilidade, LOD, LOQ precisão e exatidão, para os dois dos compostos em análise, AG e RUT. No entanto, a mesma necessita de ser otimizada para a QUER3G pois os resultados da calibração não foram os desejados. Em futuros estudos, seria importante determinar, também, a precisão e a exatidão em amostras.

O método analítico desenvolvido para determinação e quantificação de compostos fenólicos por HPLC foi validado para a sua aplicação em EM e EA de *E. paralias* e *E. hirsuta*, e permitiu uma caracterização química preliminar dos compostos fenólicos presentes nos extratos das plantas analisados. Foi realizada a identificação de cinco compostos fenólicos no EA de *E. paralias*, quatro no EM de *E. paralias*, cinco nos EM e EA de *E. hirsuta*, incluído três ácidos fenólicos (AG, ACF e ACL), uma flavanona (HESP) e dois flavonóis (RUT e QUER3G). Além dos compostos identificados, verificou-se também a existência de muitos outros para os quais não foi possível a sua identificação. O presente método permitiu, ainda, verificar que as duas espécies do género *Euphorbia*, apresentam um elevado teor de flavonóides, nomeadamente quanto à quercetina, tanto no EM como no EA destas plantas. No entanto, a composição fitoquímica quantitativa de *E. paralias* e *E. hirsuta* não foi investigada em pormenor, e, portanto, investigações futuras serão necessárias para confirmar estes resultados, ajustando as concentrações dos extratos às gamas de calibração.

Estes resultados são pioneiros na identificação de compostos fenólicos em *E. paralias* e *E. hirsuta* e revelaram-se interessantes para se poder relacionar atividades biológicas associadas a estas espécies com a sua composição química, em particular de compostos fenólicos. Assim, os compostos presentes nas duas espécies devem continuar a ser analisados, pois apresentam uma alternativa potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos à base de *Euphorbia*. De acordo com pesquisas realizadas, para além da identificação de escopoletina em *E. hirsuta*, não existem estudos que analisem compostos fenólicos presentes em extratos aquosos e metanólicos nesta espécie. Não menos importante será estender a pesquisa de compostos bioativos em espécies menos exploradas de *Euphorbia*, assim como a pesquisa de outros compostos que não os ácidos fenólicos, flavonóides e terpenos (um grupo já bastante estudado na literatura). Além disso, o método desenvolvido pode servir de modelo para a pesquisa de compostos fenólicos noutras amostras.

Referências Bibliográficas

- Al-Yousef, H. M., Alqahtani, A. S., Ghani, A. S. A., El-Toumy, S. A., El-Dougdoug, W. I. A., Hassan, W. H. B., & Hassan, H. M. (2021). Nephroprotective, cytotoxic and antioxidant activities of *Euphorbia paralias*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28, 785–792. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.011>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, B., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2020). Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & Function*. <https://doi.org/10.1039/d0fo02324h>
- Amtaghri, S., Akdad, M., Slaoui, M., & Eddouks, M. (2022). Traditional Uses, Pharmacological, and Phytochemical Studies of *Euphorbia*: A Review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 22, 1553–1570. <https://doi.org/10.2174/1568026622666220713143436>
- Aragão, N. M., Veloso, M. C. C., & Andrade, J. B. (2009). Validação de métodos cromatográficos de análise—um experimento de fácil aplicação utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e os princípios da "Química Verde" na determinação de metilxantinas em bebidas. *Química Nova*, 32(9), 2476–2481.
- Araújo, K. M., Lima, A., Silva, N., Rodrigues, L. L., Amorim, A. G., Quelemes, P. V., Santos, R. C., Rocha, J. A., Andrades, E. O., Leite, J. R., Mancini-Filho, J., & Trindade, R. A. (2014). Identification of Phenolic Compounds and Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Euphorbia Tirucalli* L. *Antioxidants*, 3, 159–175. <https://doi.org/10.3390/antiox3010159>
- Ashraf, M. A. (2020). Phytochemicals as Potential Anticancer Drugs: Time to Ponder Nature's Bounty. *Hindawi BioMed Research International*, 7. <https://doi.org/10.1155/2020/8602879>
- Azaizeh, H., Saad, B., Khalil, K., & Said, O. (2006). The State of the Art of Traditional Arab Herbal Medicine in the Eastern Region of the Mediterranean: A Review. *Oxford University Press*, 3(2), 229–235. <https://doi.org/10.1093/ecam/nel034>
- Bishop, S. L., & Murch, S. J. (2020). A systematic review of analytical methods for the detection and quantification of beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA). *Analyst*, 145, 13–28. <https://doi.org/10.1039/c9an01252d>
- Bursal, E., Köksal, E., Gülçin, İ., Bilsel, G., & Gören, A. (2013). Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC–MS/MS. *Food Research International*, 51, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.022>
- Campos, M. G. (2014). Flavonóides. In Fundação Calouste Gulbenkian (Ed.), *Farmacognosia e Fitoquímica* (4ª ed., pp. 674). ACD Print SA.

- Canas, S., Assuncao, M., Brazao, J., Zanol, G., & Eiras-Dias, J. E. (2015). Phenolic compounds involved in grafting incompatibility of *Vitis* spp: development and validation of an analytical method for their quantification. *Phytochemical Analysis*, 26, 1-7. <https://doi.org/10.1002/pca.2526>
- Chaachouay, N., Benkhniq, O., Fadli, M., El Ibaoui, H., & Zidane, L. (2019). Ethnobotanical and ethnopharmacological studies of medicinal and aromatic plants used in the treatment of metabolic diseases in the Moroccan Rif. *Heliyon*, 5(10), e02191. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02191>
- Cunha, A. P., & Batista, M. T. (2014). Taninos. In Fundação Calouste Gulbenkian (Ed.), *Farmacognosia e Fitoquímica* (4ª ed., pp. 296-320). ACDPrint.
- Cunha, A. P., Paranhos, A. H., Cavaleiro, C., Gomes, E. T., Salgueiro, L., Campos, M. G., Gonçalves, M. J., Batista, M. T., Roque, O. R., Valentão, P., Branquinho, P., & Seabra, R. (2014). *Farmacognosia e Fitoquímica* (ACDPrint, Ed. 4ª ed.). Fundação Calouste Gulbenkian.
- Cunha, A. P., & Roque, O. R. (2014a). Ácidos Fenólicos, Fenóis e seus derivados. In Fundação Calouste Gulbenkian (Ed.), *Farmacognosia e Fitoquímica* (4ª ed., pp. 218-224). ACD Print SA.
- Cunha, A. P., & Roque, O. R. (2014b). Compostos fenólicos: características e origem biossintética. In Fundação Calouste Gulbenkian (Ed.), *Farmacognosia e Fitoquímica* (4ª ed., pp. 212-215). ACD Print SA.
- Cunha, A. P., & Roque, O. R. (2014c). Compostos quinónicos: antraquinonas e naftoquinonas. In Fundação Calouste Gulbenkian (Ed.), *Farmacognosia e Fitoquímica* (4ª ed., pp. 322-340). ADCPrint.
- Cunha, A. P., & Roque, O. R. (2014d). A Farmacognosia nos estudos farmacêuticos. In Fundação Calouste Gulbenkian (Ed.), *Farmacognosia e Fitoquímica* (4ª ed., pp. 4-15). ACDPrint.
- Cunha, A. P., & Roque, O. R. (2014e). Obtenção de moléculas com atividade farmacológica a partir de material vegetal e sua transformação em medicamento. In Fundação Calouste Gulbenkian (Ed.), *Farmacognosia e Fitoquímica* (4ª ed., pp. 110-123). ACDPrint.
- Cunha, A. P., Teixeira, F. J., Silva, A. P., & Roque, O. R. (2010). *Plantas na Terapêutica - Farmacologia e Ensaio Clínicos* (G. C. Lda, Ed. 2ª ed.). Fundação Calouste Gulbenkian,.
- Dias, A. C. P., Seabra, R. M., Andrade, P. B., & Fernandes-Ferreira, M. (1999). The Development and Evaluation of an HPLC-DAD Method for the Analysis of the Phenolic Fractions from *in Vivo* and *in Vitro* Biomass of *Hypericum* Species. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 22(2), 215-227. <https://doi.org/10.1081/jlc-100101655>
- EMA. (1995). *ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* Retrieved 29/01/2022 from https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf

- Ermer, J. (2005a). Analytical Validation within the Pharmaceutical Environment. In J. Ermer & J. H. Miller (Eds.), *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: a Guide to Best Practice* (pp. 403). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.
- Ermer, J. (2005b). Performance Parameters, Calculations and Tests: Linearity. In J. Ermer & J. H. Miller (Eds.), *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: a Guide to Best Practice* (pp. 403). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.
- Ermer, J., & Burgess, C. (2005). Performance Parameters, Calculations and Tests: Detection and Quantitation Limit. In J. Ermer & J. H. Miller (Eds.), *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: a Guide to Best Practice* (pp. 403). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.
- Ernst, M., Grace, O. M., Saslis-Lagoudakis, C. H., Nilsson, N., Simonsen, H. T., & Rønsted, N. (2015). Global medicinal uses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*(176), 90-101. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.025>
- Evans, W. C. (2002). *Trease and Evans Pharmacognosy* (Elsevier, Ed. Fifteenth ed.).
- Feng, W., Hao, Z., & Li, M. (2017). Isolation and Structure Identification of Flavonoids. In *Flavonoids – From Biosynthesis to Human Health*. <https://doi.org/10.5772/67810>
- Ghani, A. E., El-Toumy, S. A., El-DougDoug, W., Mansour, A. H., W. H. , & Hassan, H. M. (2020). Chemical Profile and Hepatoprotective Activity of Ethyl Acetate Extracts of *Euphorbia paralias* and *Euphorbia geniculata* (Euphorbiaceae) from Egypt. *Pharmacognosy Journal*, 12(4), 762-770. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.109>
- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*(4), 162-169. <https://doi.org/10.1007/s10298-005-0096-8>
- González-Tejero, M. R., Casares-Porcel, M., Sánchez-Rojas, C. P., Ramiro-Gutiérrez, J. M., Molero-Mesa, J., Pieroni, A., Giusti, M. E., Censorii, E., Pasquale, C., Della, A., Paraskeva-Hadijchambi, D., Hadijchambis, A., Houmani, Z., El-Demerdash, M., El-Zayat, M., Hmamouchi, M., & Eljohrig, S. (2008). Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 341-357. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.045>
- Harris, D. C. (2007). *Quantitative Chemical Analysis* (Seventh ed.). Craig Bleyer.
- Hassan, A. R. (2022). Chemical profile and cytotoxic activity of a polyphenolic-rich fraction from *Euphorbia dendroides* aerial parts. *South African Journal of Botany*, 147, 332-339. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.01.035>
- Hlila, M. B., Majouli, K., Jannet, H. B., Aouni, M., Mastouri, M., & Selmi, B. (2017). Antimicrobial activity of Tunisian *Euphorbia paralias* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(7), 629-632. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.06.008>
- Hlila, M. B., Majouli, K., Skhiri, F. H., Jannet, H. B., Aouni, M., Mastouri, M., & Selmi, B. (2016). Total phenolic compounds, antioxidant potential and α -glucosidase inhibition by Tunisian *Euphorbia paralias*

- L. *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(8), 628–633. <https://doi.org/10.12980/jclm.4.2016J6-118>
- Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), (2005). <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
- Infarmed. (2020). *Picato – Perfil de Benefício-risco negativo*. Retrieved 20/09/2022 from https://www.infarmed.pt/web/infarmed/infarmed/-/journal_content/56/15786/3656232
- INMETRO. (2010). Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos: DOQ-CGCRE-008. In Instituto & Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (Eds.), (pp. 20). Brasil.
- Irakli, M. N., Samanidou, V. F., Biliaderis, C. G., & Papadoyannis, I. N. (2012a). Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction. *Food Chemistry*, 134, 1624–1632. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.046>
- Irakli, M. N., Samanidou, V. F., Biliaderis, C. G., & Papadoyannis, I. N. (2012b). Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in rice using solid-phase extraction and RP-HPLC with photodiode array detection. *Journal of Separation Science*, 35, 1603–1611. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200140>
- Jannet, B. S., Hymery, N. B., S. , Jdey, A., Lachaal, M., Magné, C., & Ksouri, R. (2017). Antioxidant and selective anticancer activities of two *Euphorbia* species in human acute myeloid leukemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 90, 375–385. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.072>
- Jardim Botânico UTAD. (s.d.-a). *Euphorbia hirsuta* L. Retrieved 13/10/2022 from https://jb.utad.pt/especie/Euphorbia_hirsuta
- Jardim Botânico UTAD. (s.d.-b). *Euphorbia paralias* L. . Retrieved 05/02/2022 from https://jb.utad.pt/especie/Euphorbia_paralias
- JASCO. (s.d). *A comprehensive range of high performance optical detectors*. Retrieved 01/10/2022 from <https://www.jasco.de/Chromatography/LC-4000-Series/Detectors>
- Kasmi, S., Hamdi, A., Atmani-Kilani, D., Debbache-Benaida, N., Jaramillo-Carmona, S., Rodríguez-Arcos, R., Jiménez-Araujo, A., Ayouni, K., Atmani, D., & Guillén-Bejarano, R. (2021). Characterization of phenolic compounds isolated from the *Fraxinus angustifolia* plant and several associated bioactivities. *Journal of Herbal Medicine*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100485>
- Kebal, L., Pokajewicz, K., Djebli, N., Mostefa, N., Poliwoda, A., & Wieczorek, P. P. (2022). HPLC-DAD profile of phenolic compounds and *In vitro* antioxidant activity of *Ficus carica* L. fruits from two Algerian varieties. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 155, 113738. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113738>

- Kemboi, D., Peter, X., Langat, M., & Tembu, J. (2020). A Review of the Ethnomedicinal Uses, Biological Activities, and Triterpenoids of *Euphorbia* Species. *Molecules*, 25, 29. <https://doi.org/10.3390/molecules25174019>
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 16. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Magozwi, D. K., Dinala, M., Mokwana, N., Siwe-Noundou, X., Krause, R. W. M., Sonopo, M., McGaw, L. J., Augustyn, W. A., & Tembu, V. J. (2021). Flavonoids from the Genus *Euphorbia*: Isolation, Structure, Pharmacological Activities and Structure-Activity Relationships. *Pharmaceuticals*, 14. <https://doi.org/10.3390/ph14050428>
- Mallik, B., Chakravarti, B., & Chakravarti, D. N. (2008). Overview of Chromatography. In Gallagher & Wiley (Eds.), *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. John Wiley & Sons.
- Merrouni, I. A., & Elachouri, M. (2020). Anticancer medicinal plants used by Moroccan people: Ethnobotanical, Preclinical, Phytochemical and Clinical evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, 114. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113435>
- Messaoudene, L., Lovillo, M. P., Hazzit, M., & Djerbar, R. (2018). Optimization of phenolic compounds extraction conditions from artichoke (*Cynara scolymus* L.), antioxidant activity and comparison between Folin-Ciocalteu and UV methods for total phenolic content quantification. *Tom XXV*(2), 52-62. <http://www.bioresearch.ro/revistaen.htm>
- Murray, M. T. (2020). Botanical Medicine – A Modern Perspective. In *Textbook of Natural Medicine* (Fifth ed., pp. 264-268.e261). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-43044-9.00034-0>
- Nag, M., Kar, A., Chanda, J., & Mukherjee, P. K. (2020). RP-HPLC analysis of methanol extract of *Viscum articulatum*. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicina*, 11, 277-280. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2018.02.135>
- Oliveira, D. M., & Bastos, D. H. M. (2011). Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Química Nova*, 34(6), 1051-1056. <https://www.scielo.br/j/qn/a/YXMrPRJQT6kYdkv7NQThdDb/?format=pdf&lang=pt>
- Özbilgin, S., Acikara, Ö. B., Akkol, E. K., Süntar, I., Keles, H., & İşcan, G. S. (2018). In vivo wound-healing activity of *Euphorbia characias* subsp. *wulfenii*: Isolation and quantification of quercetin glycosides as bioactive compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 224, 400-408. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.06.015>
- Pincus, M. R., Lifshitz, M. S., & Bock, J. L. (2022). Analysis: Principles Of Instrumentation. In Elsevier Inc (Ed.), *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* (Twenty Fourth ed.). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-67320-4.00004-3>
- Pinto, M. (2011). *Manual de Trabalhos Laboratoriais de Química Orgânica e Farmacêutica* (Lidel, Ed.).

- Refahy, L. (2011). Study on Flavonoids and Triterpenoids Content of some Euphorbiaceae Plants. *Journal of Life Sciences*, 5, 100-107. <https://www.researchgate.net/publication/273351317>
- RELACRE. (2000). Guia RELACRE 13: Validação de métodos internos de ensaio em análise química. In Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (Ed.).
- Ribani, M., Bottoli, C., Collins, C., Jardim, I., & Melo, L. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27(5), 771-780.
- Ribeiro, A. (2021). *Antioxidant and Antimicrobial Activity of Plants from Portuguese Flora* [Mestrado em Farmácia, Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico Porto]. RECIPP. Porto. <http://hdl.handle.net/10400.22/17539>
- Safwat, N. A., Kashef, M. T., Aziz, R. K., Amer, K. F., & Ramadan, M. A. (2018). Quercetin 3-O-glucoside recovered from the wild Egyptian Sahara plant, *Euphorbia paralias* L., inhibits glutamine synthetase and has antimycobacterial activity. *Tuberculosis* 108, 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.11.005>
- Salehi, B., Iriti, M., Vitalini, S., Antolak, H., Pawlikowska, E., Kregiel, D., Sharifi-Rad, J., Oyeleye, S. I., Ademiluyi, A. O., Czopek, K., Staniak, M., Custódio, L., Coy-Barrera, E., Segura-Carretero, A., Cádiz-Gurrea, M. L., Capasso, R., Cho, W. C., & Seca, A. M. L. (2019). *Euphorbia*-Derived Natural Products with Potential for Use in Health Maintenance. *Biomolecules*, 9, 22. <https://doi.org/10.3390/biom9080337>
- Skendi, A., Irakli, M. N., & Chatzopoulou, P. (2017). Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 6, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.02.001>
- Tanaka, N., & Kashiwada, Y. (2021). Phytochemical studies on traditional herbal medicines based on the ethnopharmacological information obtained by field studies. *Journal of Natural Medicines*, 75, 762-783. <https://doi.org/10.1007/s11418-021-01545-7>
- Valente, C., Ferreira, M. J. U., Abreu, P. M., Pedro, M., Cerqueira, F., & Nascimento, M. S. J. (2003). Three New Jatropane-Type Diterpenes from *Euphorbia pubescens*. *Planta Medica*, 69, 361-366. <https://doi.org/10.1055/s-2003-38875>
- Vasas, A., & Hohmann, J. (2014). *Euphorbia* Diterpenes: Isolation, Structure, Biological Activity, and Synthesis (2008-2012). *Chemical Reviews*, 114, 8579-8612. <https://doi.org/10.1021/cr400541j>
- Vu, D. C., Vo, P. H., Coggeshall, M. V., & Lin, C. H. (2018). Identification and Characterization of Phenolic Compounds in Black Walnut Kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 4503-4511. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01181>

- Wang, Z. Y., Liu, H. P., Zhang, Y. C., Guo, L. Q., Li, Z. X., & Shi, X. F. (2012). Anticancer potential of *Euphorbia helioscopia* L extracts against human cancer cells. *The Anatomical Record*, *295*, 223–233. <https://doi.org/10.1002/ar.21517>
- Yao, L., Jiang, Y., Datta, N., Singanusong, R., Liu, X., Duan, J., Raymont, K., Lisle, A., & Xu, Y. (2004). HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. *Food Chemistry*, *84*, 253–263. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(03\)00209-7](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(03)00209-7)
- Zhang, L., Wang, C., Meng, Q., Tian, Q., Niu, Y., & Niu, W. (2017). Phytochemicals of *Euphorbia lathyris* L. and Their Antioxidant Activities. *Molecules*, *22*(1335). <https://doi.org/10.3390/molecules22081335>