



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PLANEJAMENTO *SIMPLEX-CENTROIDE* DE MISTURAS DE SOLVENTES
PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS
EXTRATOS DE *Eriope blanchetii* (LAMIACEAE)

ILHÉUS-BA

2017

WELLINGTON GOMES DE LIMA

PLANEJAMENTO *SIMPLEX-CENTROIDE* DE MISTURAS DE SOLVENTES
PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS
EXTRATOS DE *Eriope blanchetii* (LAMIACEAE)

Dissertação apresentada para obtenção de título de mestre acadêmico em química à Universidade Estadual de Santa Cruz.

Área de concentração: Recursos Naturais e Tecnologia

Orientador: Prof. Dr. Luciano da Silva Lima

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rosilene Aparecida de Oliveira

ILHÉUS-BA

2017

L732 Lima, Wellington Gomes de.
Planejamento simplex-centroide de misturas de
solventes para extração de compostos fenólicos e
avaliação biológica dos extratos de *Eriope*
blanchetii
(Lamiaceae) / Wellington Gomes de Lima. –
Ilhéus,
BA: UESC, 2017.
66 f. : il.

Orientador: Luciano da Silva Lima.
Coorientadora: Rosilene Aparecida de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
de Santa Cruz. Programa de Pós Graduação em
Química.
Referências bibliográficas: f. 63-66.

1. Química. 2. Solventes. 3. Ácido rosmarínico. 4.
Antioxidantes. 5. *Artêmia salina*. I. Título.

CDD 540

WELLINGTON GOMES DE LIMA

PLANEJAMENTO SIMPLEX-CENTROIDE DE MISTURAS DE SOLVENTES
PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO
BIOLÓGICA DOS EXTRATOS DE *Eriope blanchetii* (LAMIACEAE)

Ilhéus-BA, Ilhéus 20 de março de 2017.

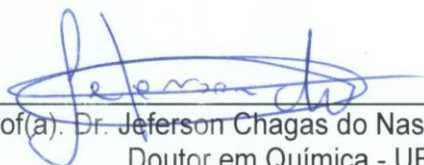
COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof(a). Dr. Luciano da Silva Lima
Doutor em Química - UFBA
Instituto Federal da Bahia - IFBA Orientador(a)



Prof(a). Dr. Francisco Herberto Martínez Luzardo - UESC
Doutor em Ciências Técnicas - CNPCC
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC



Prof(a). Dr. Jeferson Chagas do Nascimento - UESB
Doutor em Química - UFBA
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

DEDICATÓRIA

À Deus, à toda minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado sempre a saúde, inteligência e experiência no meu caminho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano da Silva Lima por ter me concedido a oportunidade de me orientar, me auxiliar na pesquisa com experiências importantes e contribuir sempre que possível na minha qualificação profissional.

À minha coorientadora Prof^ª. Dr^ª Rosilene Aparecida de Oliveira que além de dedicação, amizade, incentivo e confiança, foi de forma imprescindível responsável pelo meu aperfeiçoamento profissional e humano desde o meu início de jornada acadêmica.

Ao Prof. Dr. Fernando Faustino de Oliveira por ter me auxiliado generosamente na minha formação profissional como estágio docente, pela amizade, conversas e apoio à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Raildo Mota de Jesus, como representante competente do colegiado de Pós-Graduação em Química (PPGQuim), que sempre me auxiliou em suas aulas e experiências significativas, além de forte apoio nas pesquisas laboratoriais, em divulgação e realização de eventos, seminários e outras atividades acadêmicas que contribuíram na minha formação profissional.

À todos os membros docentes do PPGQuim por terem me concedido experiências construtivas em suas aulas teóricas e práticas, nos quais tive a oportunidade de aperfeiçoar e adquirir conhecimentos necessários para desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Janclei Pereira Coutinho pelas conversas, troca de experiências e pelas contribuições importantes no desenvolvimento inicial do meu trabalho relacionado à análises cromatográficas em parceria com André Luíz Sampaio.

Ao Prof. Dr. Jorge Maurício David (UFBA) por disponibilizar apoio e uso do equipamento de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, ao Prof. Dr. Marcus Luciano S.F. Bandeira (IFBA-Campus Porto Seguro) pela contribuição e idéia inicial de estudo e aplicação de planejamento de experimento de mistura, à Gessica Carvalho Pereira e Lorena Savazini pelo apoio e realização de testes de inibição AChE em extratos orgânicos.

Aos meus colegas e amigos de PPGQuim em que dividir grandes experiências e estabelecemos diferentes amizades com valor humano e profissional, nos quais foram: Ivero Pita de Sá, Analú Rocha, Analú Reis, José Lucas, Herick Macedo, Bruna Bernades, Randilla Cordeiro, Iago Maciel, Ohana Nadine, Milana Aboreira, Alex Souza e Erivelton Souza.

Aos grupos de pesquisa de Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais e Síntese (LPPNS), Laboratório de Pesquisa em Química Analítica (LPQA), à Gerência de Laboratório (GERLAB), ao Instituto de Química da UFBA, Centro de Pesquisas em Ciências e Tecnologias das Radiações (CTR) por me possibilitarem infraestrutura necessárias para realizações do meu trabalho experimental, em obtenção e análises de extratos.

Aos membros externo e interno de qualificação, Prof. Dr. Miquéias Feliciano de Almeida e ao Prof. Dr. Fernando Faustino de Oliveira, que puderam comparecer, avaliar e contribuir de forma significativa durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos membros externo e interno de defesa de dissertação, Prof. Dr. Francisco Heriberto Martinez Luzardo e Prof. Dr. Jeferson Chagas do Nascimento que puderam está presente para avaliar e contribuir para finalização do meu trabalho de mestrado.

Aos profissionais técnicos dos colegiados PPGQuim e do curso de química da UESC nos quais destaco a amizade e competência de Maurício Dezidério e Lúcia Maria.

À minha família, em especial aos meus pais Eustácio de Lima Oliveira e Osminda Gomes de Lima, que me ensinaram e me ensinam até hoje a determinação, paciência e superação de dificuldades.

Ao meu grande irmão Gabriel Gomes de Lima pelas conversas construtivas, trocas de experiências, incentivo e amizade.

Aos meus demais parentes no qual cito meus grandes fã: meus avós Maria Odete de Souza, Maria de Lima Oliveira; meus avôs Petronilo Rodrigues Oliveira e Osmar Gomes; meus primos nos quais considero como grandes irmãos, Fábio Santos e Fabíola Santos.

Ao meu grande amigo Victor Leandro Aranha Pereira em que de todas as formas foi de minha grande confiança, um camarada e apoio de fé inestimável. Também a sua companheira Lucimara Santa Fé por depositar carinho, respeito e amizade.

À Vanessa Souza Ramos e sua família que de forma especial me depositaram confiança, carinho e cuidado com sentimentos recíprocos e saudáveis.

À FAPESB, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro nesse trabalho.

EPÍGRAFE

*“O Mestre deve ser meio sério,
para dar autoridade à lição e meio
risonho, para obter o perdão da
correção.”*

(Machado de Assis)

RESUMO

A família Lamiaceae é composta por muitas espécies; dentre essas, a *Eriope blanchetii*, encontrada no interior da Mata Atlântica em regiões de restingas e dunas. Em estudos anteriores com a espécime encontrada em Salvador-BA, foi relatado o isolamento de algumas substâncias fenólicas, dentre essas destaca-se o isolamento do ácido rosmarínico, a partir de extratos orgânicos de folhas e caule. O ácido rosmarínico possui diversas propriedades biológicas, tais como: antioxidante, anti-inflamatória, inibidora enzimática dentre outras. Como objetivo, foi proposto a extração maximizada de compostos fenólicos em folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* através do estudo de misturas de solventes (*Simplex-centroide*) e avaliar nos extratos, a atividade biológica quanto ao índice de atividade antioxidante (IAA), teste de letalidade frente a *Artemia salina* e teste de inibição acetilcolinesterase (AChE). Para a extração de compostos fenólicos totais em amostras de *E. blanchetii* foram utilizados os solventes etanol, acetato de etila e clorofórmio nas formas isoladas e de misturas. Os teores de fenólicos totais foram determinados para cada extrato por tipo de misturas avaliados estatisticamente para determinação de modelo matemático de misturas (linear, quadrático ou cúbico especial) e delimitação experimental *Simplex-centroide*.

Foi estabelecido a mistura binária v/v (1:1) de etanol e acetato de etila como fator resposta em maximização de teores de fenólicos totais em extratos de folha, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* em que conferiram teores médios de fenólicos totais de 8331,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (folhas), 60484,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (partes aéreas) e 3527,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (caule) com teores de ésteres de ácidos fenólicos equivalente em padrão de ácido rosmarínico de 1854,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (folhas), 358,6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (partes aéreas) e 341,8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (caule). Na análise de atividade antioxidante, pelo método de reação de sequestro de radical estável DPPH, o extrato de folhas foi avaliado como o mais antioxidante (IAA: 2,22 e CE_{50} : 646,71 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em relação aos demais extratos. No teste de letalidade frente a *A. salina*, ambos os extratos apresentaram concentrações letais de (CL_{50}) de: 171,4737 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (folhas), 59,2089 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (partes aéreas) e 30,3644 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (caule) como indícios de potencial bioativo. O extrato de partes aéreas apresentou menor concentração inibitória de AChE (CI_{50} = 23,73 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) comparado ao padrão de Fisostigmina (CI_{50} = 14,86 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Palavras chaves: Otimização de misturas de solventes, Ácido rosmarínico, Atividade antioxidante, Letalidade frente *Artemia salina*, Inibição AChE.

ABSTRACT

The Lamiaceae family is composed of many species. Among them the *Eriope blanchetii*, found in the interior of the Atlantic Forest, in restingas and dunes regions in the Lagoa de Abaeté. In 2001, a study with this species reported the isolation of phenolic substances, among them the isolation of rosmarinic acid, from organic extracts of leaves and stem. A previous study with this species reported (in 2001) the isolation of some phenolic substances, among them the isolation of rosmarinic acid, from organic extracts of leaves, aerial parts and stem. Rosmarinic acid has several biological properties, such as: antioxidant, anti-inflammatory, enzymatic inhibitor among others. The objective of this study was to maximize the extraction of phenolic compounds in leaves, aerial parts and stem of *E. blanchetii* through the study of solvent mixtures (simplex-centroid) and to evaluate in optimized extracts the biological activity of extracts optimized for activity index Antioxidant (IAA), lethality test against *Artemia salina* and acetylcholinesterase inhibition test (AChE).

For the extraction of total phenolics in samples of *E. blanchetii* were used ethanol, ethyl acetate and chloroform solvents in the isolated and blends forms. The total phenolic contents were determined for each extract by type of mixtures evaluated statistically for the determination of the mathematical model of mixtures (linear, quadratic or special cubic) and simplex-centroid experimental delineation. The binary v / v (1: 1) mixture of ethanol and ethyl acetate was established as a response factor in maximization of total phenolic contents in leaf extracts, aerial parts and stem *E. blanchetii*. The mean total phenolic contents were 8331.1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (leaves), 60484.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (aerial parts) and 3527.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (stem) with contents of acid esters (1854.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (leaves), 358.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (aerial parts) and 341.8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (stem). The extract of leaves as the most antioxidant (IAA: 2.22 and EC_{50} : 646.71 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was obtained in the analysis of the antioxidant activity of the optimized extracts in relation to the other extracts. In the lethality test against *A. salina*, both optimized extracts presented lethal concentrations of (LC_{50}) of 171.4737 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (leaves), 59.2089 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (aerial parts) and 30.3644 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (stem) as evidence of bioactive potential. The optimized extract of aerial parts had a lower inhibitory concentration of AChE (IC_{50} = 23.73 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) compared to the Physostigmine standard (IC_{50} = 14.86 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Keywords: Optimization of solvent mixtures, Rosmarinic acid, Antioxidant activity, Lethality front *Artemia salina*, AChE Inhibition.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Uma das espécimes de <i>E. blanchetti</i> encontrado em Restinga da Lagoa do Abaeté, Salvador-Ba. Foto: Hugo N. Brandão. Fonte:(LIMA, 2009).....	3
Figura 2. Distribuição de espécimes <i>E. blanchetii</i> (Lamiaceae) Fonte: CNCFlora avaliado por Maria Marta V. de Moraes, revisado por Miguel d'Avila de Moraes. Data: 04-04-2012..	4
Figura 3. Substâncias fenólicas isoladas em extratos orgânicos de <i>E. blanchetii</i>	5
Figura 4. Pentagaloglicose; forma glicosilada composta de 5 ácidos gálicos ligados na molécula de glicose. Imagem obtida e adaptada (DEWICK, 2002).	6
Figura 5. Alguns exemplos estruturais de ácidos fenólicos comuns como compostos fenólicos	7
Figura 6. Rota biosintética do ácido hidroxibenzóicos a partir de derivados fosfopiruvatos e triosefosfatos. Imagem obtida e adaptada (DEWICK, 2002).	9
Figura 7. Biossíntese de conversão do ácido chiquímico em ácido corísmico (DEWICK, 2002).	10
Figura 8. Rota mistas de formação de ácidos hidroxicinâmicos (DEWICK, 2002).	11
Figura 9. Rota de biossíntese do ácido rosmarínico a partir de processos enzimáticos de esterificação de ácidos hidroxicinâmicos (KIM et al., 2015).	12
Figura 10. Ação antioxidante "scavenger" de ácidos o-hidroxicinâmicos e cafeico e seus respectivos Índices de Atividade Antioxidante (IAA) conhecidos conforme a presença de de grupos hidroxilas (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996)	16
Figura 11. Propriedade antioxidante ácido rosmarínico na captura de radical livre (R^*) e estabilização por ressonância comuns em derivados ésteres de ácidos hidroxicinâmicos.	17
Figura 12. Algumas das substâncias utilizadas comercialmente no tratamento de mal de Alzheimer, segundo Feitosa (2015), com baixos efeitos colaterais.....	18
Figura 13. Representação espacial do planejamento simplex-centroide de componentes x1, x2 e x3 para análise de designer de interações do componentes indicado em 7 posições do triangulo equilátero.	25
Figura 14. Exemplo hipotético de análise de pseudo misturas de 3 componentes (x1,x2,x3) em região otimizada. Linha vermelha efeito antagônico e linha preta de sinergismo. Composição de misturas entre 0 e 1 para cada componente.....	26
Figura 15. Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu (OLIVEIRA et al., 2009)	36

Figura 16. Curva analítica em ácido gálico obtida pelos sinais de absorvância (ABS) entre 10 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	36
Figura 17. Razão percentual dos valores obtidos e preditos pela curva analítica demonstrando precisão no preparo de concentrações analíticas.	38
Figura 18. Correlação entre teor de extrato (Me) em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, representado em barras e teor de fenólicos totais (FT) em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, representado em linhas, para cada extrato de folhas (F), partes aéreas (P) e caule (C) de <i>E. blanchetii</i> obtidos em relação ao planejamento de misturas de solventes etanol (E), acetato de etila (A) e Clorofórmio (C).	41
Figura 19. Gráfico de resíduos plotados de acordo com os modelos matemáticos linear, quadrático e cúbico especial. A linha vermelha corresponde ao R^2 ajustado e os círculos em azul como resíduo obtido na relação de valores preditos (eixo vertical) com os valores observados (eixo horizontal) calculados pelo Statistica v. 7.	43
Figura 20. Superfície de resposta ao delimitamento experimental do modelo matemático simplex-centroide cúbico especial para avaliação do fator resposta em extratos obtidos de folhas de <i>E. blanchetii</i>	45
Figura 21. Superfície de resposta ao delimitamento experimental do modelo matemático simplex centroide cúbico especial para avaliação do fator resposta em extratos obtidos de partes aéreas de <i>E. blanchetii</i>	46
Figura 22. Superfície de resposta ao delimitamento experimental do modelo matemático simplex centroide cúbico especial para avaliação do fator resposta em extratos obtidos de partes aéreas de <i>E. blanchetii</i>	46
Figura 23. Efeito forte de sinergismo confirmado matematicamente do solvente clorofórmio (solvente C) e em relação aos outros solventes etanol (E) e acetato de etila (A) com pseudo-misturas apenas em amostras de caule de <i>E. blanchetii</i>	48
Figura 24. Reação de ácido rosmarínico com acetato de chumbo II em meio aquoso para formação de clorogenato de chumbo II	49
Figura 25. Espectro ao lado esquerdo correspondente ao efeito hipsocrômico com banda de absorvância em 324 nm do padrão de ácido rosmarínico (espectro em azul) frente a adição de acetato de chumbo II. Espectros ao lado direito correspondente aos extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de <i>E. blanchetii</i> em $170 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	50
Figura 26. Efeito hipsocrômico em 324 nm dos extratos de <i>E. blanchetii</i> nas soluções analisadas de $170 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (folhas), $650 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (partes aéreas) e $720 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (caule).	51

Figura 27. Curva analítica de padrão de ácido rosmarínico (em azul) com adição e sem adição de acetato de chumbo II (laranja).....	51
Figura 28. Perfil cromatográfico do padrão de ácido rosmarínico em 254 nm sob o fluxo de 0,5 ml. min ⁻¹ e varredura espectral obtido pelo detector DAD do padrão de ácido rosmarínico.	54
Figura 29. Curva analítica de ácido rosmarínico com DAD ajustado para 254 nm.	55
Figura 30. Perfil cromatográfico e da varredura espectral DAD de injeção de 5 µL de extrato otimizado de folhas de <i>E. blanchetii</i> sob o fluxo de 0,5 ml·min ⁻¹	56
Figura 31. Gráfico de pizzas para composição percentual de substâncias extraíveis no método otimizado em amostras secas de folhas com solvente etanol e acetato de etila 1:1 e composição percentual de em relação ao conteúdo total de fenólicos totais avaliados. ...	57
Figura 32. Reação e equilíbrio químico esquemático de uma substancia antioxidante qualquer doadora de hidrogênio (R-H) com radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). 58	
Figura 33. Plotagem dos valores obtidos da media percentual de sequestro de radicais livres (%SRL) em relação as diferentes concentrações equidistantes do padrão BHT e dos extratos otimizados <i>E. blanchetii</i>	60
Figura 34. Regressão dos dados obtidos em extratos de folhas, partes aéreas e caule pela mistura de solventes etanol e acetato de etila 1:1	65
Figura 35. Reações químicas envolvidas na análise quantitativa do teste de inibição AChE desenvolvido por Ellman e colaboradores (1961). Figura adaptada e obtido por Lima (2009).	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação geral de compostos fenólicos principais de acordo com sua estrutura química básica e classes pertencentes.....	6
Tabela 2. Análise de variância para significância de um modelo matemático <i>simplex-centroide</i>	24
Tabela 3. Planejamento de mistura de solventes a serem empregados na obtenção de extratos orgânicos por maceração exaustiva de folhas (F), parte aéreas (P) e caule (C) <i>E. blanchetii</i>	28
Tabela 4. Teor de extratos obtidos pelo planejamento <i>simplex-centroide</i> de misturas de 3 componentes.	35
Tabela 5. Dados obtidos a partir da curva analítica, medidas de 30 sinais de branco analítico e sua equivalência em concentração analítica ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e quantidade analítica (μg).....	38
Tabela 6. Teor de compostos fenólicos totais (FT) expresso em massa de fenóis totais contido em massa seca de amostra de folhas (F), partes aéreas (P) e caule (C).	40
Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) dos modelos matemáticos <i>simplex-centroide</i> para escolha do modelo matemático significativo que melhor represente o experimento quanto ao fator resposta de determinação de compostos fenólicos totais.....	42
Tabela 8. Análise quantitativa de ésteres de ácidos fenólicos em extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de <i>E. blanchetii</i>	52
Tabela 9. Resultado do teste de fortificação de solução de extrato otimizado de folhas com variação de 3 níveis de concentração padrão de ácido rosmarínico	53
Tabela 10. Variações aleatória de volumes de injeções utilizadas para a obtenção de curva analítica de ácido rosmarínico e quantidades detectadas entre 38,5 à 275 pg equivalente em unidades de área (mAu) do detector DAD sob fluxo de $0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, tempo de retenção de 9,6 min e em 329 nm.	55
Tabela 11. Quantificação de ácido rosmarínico em extrato otimizado de folhas de <i>E. blanchetii</i> através da curva analítica $y = 1908,3x + 2203,6$ e injeção de $5\ \mu\text{L}$ de amostra, em 254 nm, $T_r = 9,6\text{ min}$ e fluxo de análise cromatográfica de $0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em CLAE-DAD.....	56
Tabela 12. Tempo de reação do extrato otimizado de folhas de <i>E. blanchetii</i>	59
Tabela 13. Padrão de BHT variando concentração e média percentual de sequestro de radicais livre (% SRL) e seus respectivos coeficientes de variação (% CV) para obtenção da equação de regressão linear	59

Tabela 14. Análise de extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de <i>E. blanchetii</i> expressos em média percentual (%SRL) e coeficiente de variação percentual (%CV) para obtenção da equação de regressão linear.	60
Tabela 15. Resultado expresso em CE ₅₀ e IAA da análise de extratos (folhas, partes aéreas e caule) pela mistura de solventes etanol e acetato de etila 1:1 comparado com o padrão BHT.....	61
Tabela 16. Determinação da solubilidade dos extratos otimizados de <i>Eriope blanchetii</i> em solução aquosa de água do mar com 1% de DMSO	63
Tabela 17. Representações quantitativas de indivíduos mortos <i>A. salina</i> avaliados em diferentes concentrações de extrato otimizado de folhas de <i>E. blanchetii</i>	63
Tabela 18. Representações quantitativas de indivíduos mortos <i>Artemia salina</i> avaliados em diferentes concentrações de extrato otimizado de partes aéreas de <i>Eriope blanchetii</i>	64
Tabela 19. Representações quantitativas de indivíduos mortos <i>A. salina</i> avaliados em diferentes concentrações de extrato otimizado de caule de <i>E. blanchetii</i>	64
Tabela 20. Dados pertinentes a estimativa de Concentração letal (CL ₅₀) correspondentes a letalidade dos extratos otimizados de <i>E. blanchetii</i>	65
Tabela 21. Equações correspondentes à regressão linear dos padrões e dos extratos otimizados de <i>E. blanchetii</i> com os respectivos coeficientes de determinação (r^2) e CI ₅₀ determinados.	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- %CV: coeficiente de variação percentual
- .s: coeficiente angular da curva analítica
- 3-H e 3'-H,4C-pHPL: Enzima hidroxicinamioli-CoA-hidroxifenilacetato hidroxicinamoil transferase
- 3-H e 3'-H, Caf-pHPL: Enzima cafeioil-4'-hidroxifenilacetato 3/3'-hidroxilase
- 4CL: Ácido 4-cumarico-CoAcetil-ligase
- ABS: Absorvância
- AChE: Enzima acetilcolinesterase
- ANOVA: Análise de variância
- ATP: Trifosfato de adenosina
- BHT: Hidroxitolueno butilado
- CBs: Compostos bioativos
- CE₅₀: Concentração efetiva de 50%
- CHA: Ácido cinâmico 4-hidroxilase
- CL₅₀: Concentração letal
- CNCFlora: Centro nacional de conservação da Flora
- DAHP: 3-desoxi-arabinoheptulsonato-7-fosfato
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DPPH: 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl
- E, A e C: Etanol, Acetato de etila e Clorofórmio (ou C = T= triclorometano)
- F, P e C: Folhas, Partes aéreas e Caule
- F°: Teste de significância entre os valores experimentais e teóricos
- GL: Graus de liberdade
- H₀ e H_i: Hipótese nula e Hipótese não nula
- HPPR: Hidroxifenilpiruvato redutase
- IAA: Índice de atividade antioxidante
- INEMA: Instituto do meio ambiente e recursos hídricos
- LD: Limite de detecção
- LQ: Limite de quantificação
- MA: mal de Alzheimer
- N: Número de observações
- NAD: Dinucleótido de nicotinamida

P: Número de parâmetros estimados no modelo

PAL: Fenilalanina de amônia liase

PEP: Fosfato de fosfoenolpiruvato

PLP: Piridoxal 5-fosfato

R^2 : Coeficiente de determinação múltipla

RAS: Ácido rosmarínico sintase

S: desvio padrão das medidas do branco

SNUC: Sistema nacional de unidade de conservação

SRL: Sequestro de radicais livres

SS_E : Soma dos quadrados dos resíduos

SS_R : Soma dos quadrados dos valores fornecidos pelo modelo de regressão

SS_T : Soma dos valores observados

TAT: Tirosina aminotransferase

TEAF: Teor de ésteres de ácidos fenólicos

α : Nível de significância

χ^2 : Teste qui-quadrado

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTAS DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1. Objetivo geral	2
2.2. Objetivos específicos.....	2
3. REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1. Considerações Gerais sobre a espécie <i>Eriope blanchetii</i>	3
3.2. Compostos fenólicos	6
3.3. Biossíntese de ácidos fenólicos e compostos derivados.....	8
3.4. Avaliação biológica.....	14
3.4.1. Letalidade frente a <i>Artemia salina</i>	14
3.4.2. Atividade antioxidante	15
3.4.3. Atividade acetilcolinesterásico.....	18
3.5. Extração de substâncias fenólicas	20
3.5.1. Estudo de misturas para otimização de extração	22
3.5.2. Modelos matemáticos de misturas	23
3.5.3. Delimitação <i>simplex-centroide</i>	25
4. METODOLOGIAS	27
4.1. Coleta e identificação de material vegetal.....	27
4.2. Equipamentos e reagentes utilizados.....	27
4.3. Obtenção de extratos orgânicos.....	28
4.3.1. Planejamento de misturas de solventes.....	28
4.3.2. Quantificação de fenólicos totais - Método de Folin & Ciocalteu.....	29
4.3.3. Avaliação <i>simplex-centroide</i> – Fator resposta	29
4.4. Determinação de derivados ácidos fenólicos dos extratos otimizados.....	30
4.4.1. Análise de ésteres de ácidos fenólicos	30
4.4.2. Determinação cromatográfica de ácido rosmarínico	31
4.5. Avaliação biológica dos extratos otimizados	32

4.5.1. Atividade antioxidante	32
4.5.2. Letalidade frente <i>Artemia salina</i>	33
4.5.3. Avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
5.1. Avaliação <i>simplex-centroide</i> nos extratos	35
5.1.1. Determinação de fenólicos totais	36
5.1.2. Designação de modelo de misturas.....	42
5.1.3. Delimitação <i>simplex-centroide</i>	45
5.2. Determinação de ácidos fenólicos	49
5.2.1. Determinação de ésteres de ácidos fenólicos.....	49
5.2.1. Identificação e quantificação de ácido rosmarínico.....	54
5.3. Avaliação biológica nos extratos otimizados	58
5.3.1. Atividade antioxidante	58
5.3.2. Letalidade frente a <i>Artemia salina</i>	63
5.3.3. Teste acetilcolinesterásico.....	66
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos e polifenólicos são substâncias amplamente distribuídas no reino vegetal e podem ser extraídas por diferentes métodos de extração sendo que a maceração exaustiva por solventes orgânicos são mais utilizadas em estudos químicos de obtenção de extratos (DEWICK, 2002). Especificamente, para obtenção de ácidos fenólicos estáveis, por exemplo os derivados hidroxicinâmicos (MOORES; DOROTHY; WOOD, 1948).

Os ácidos hidroxicinâmicos são geralmente considerados como compostos bioativos por apresentarem propriedades biológicas benéficas à saúde em prevenção e tratamento de doenças (OLIVEIRA et al., 2011). Dentre os vários tipos relatados na literatura destaca-se o ácido rosmarínico, que apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatórias, antitumorais, antiviral, antialérgicos e outras. diferentes concentrações de ácido rosmarínico podem exercer propriedades farmacológicas de atividades antioxidantes, antialérgicos e inibidores enzimáticos (KIM et al., 2015).

Alguns autores atribui à maioria das espécies Lamiaceae como espécies biossintetizadores de compostos fenólicos, tal como ésteres de ácidos hidroxicinâmicos, também denominados de ésteres de ácidos cumáricos ou ácidos clorogênicos (MARIA; MOREIRA, 2004; OSAKABE et al., 2002).

Em estudo anterior com a espécie *Eriope blanchetii* (Lamiaceae) identificada na Mata Atlântica, parque Metropolitano de Salvador-BA, foi comprovado o isolamento de ácido rosmarínico (LIMA, 2009). Devido a isso, suspeita-se a existência de outros ácidos fenólicos nessa espécie e que a obtenção de extratos por planejamento de misturas de solventes poderia ser uma alternativa de maximizar a obtenção desses composto fenólicos.

Sendo assim, o presente trabalho propõe o estudo de otimização de misturas de solventes polares (etanol, acetato de etila e clorofórmio) para extração maximizada de substâncias fenólicas, incluindo ésteres de ácidos fenólicos, para posteriormente avaliar as propriedades biológicas, tal como toxicidade, atividade antioxidante e teste de inibição de enzima acetilcolinesterase (AChE).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o teor de compostos fenólicos totais e ésteres de ácidos fenólicos em extratos de folhas, partes aéreas e caule de *Eriope blanchetii* (Lamiaceae) e suas avaliações biológicas quanto as propriedades antioxidantes, letalidade e capacidade antiacetilcolinesterase.

2.2. Objetivos específicos

-Estabelecer a extração maximizada de compostos fenólicos totais em amostras de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* através do estudo de planejamento de mistura *simplex-centroide* com solventes: etanol, acetato de etila e clorofórmio.

-Determinar o teor de fenólicos totais, pelo uso de reagente *Folin & Ciocalteou*, teor de ésteres de ácidos fenólicos dos extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii*.

-Identificar e quantificar o ácido rosmarínico por cromatografia líquida de ultra eficiência, em fase reversa, acoplado ao detector DAD do extrato otimizado de *E. blanchetii* de maior teor de ésteres de ácidos fenólicos.

-Estimar a letalidade dos extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* frente a indivíduos vivos de *Artemia salina* como triagem de potencial bioativo farmacológico.

-Realizar nos extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* o teste de inibição enzimática acetilcolinesterase (AChE).

-Contribuir para os estudos de biodiversidade da Mata Atlântica no âmbito dessa espécie *E. blanchetii* de Salvador-BA e relevância à pesquisa na área de recursos naturais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Considerações Gerais sobre a espécie *Eriope blanchetii*

Pode-se estimar que cerca de 64 % de espécies da família Lamiaceae são do tipo nativas e apenas cerca de 8% dessas espécies foram estudadas do ponto de vista fitoquímico e biológico (DAVID et al., 2012; SANTOS et al., 2011; PAVARINI; LOPES, 2016). Dentre os gêneros pertencentes à família Lamiaceae existem poucos estudos químicos relatados sobre o gênero *Eriope*.

O gênero *Eriope* é nativo das regiões tropical e subtropical da América do Sul e possui cerca de 20 espécies, sendo que 18 destas estão restritas ao território brasileiro. No Brasil, estas espécies distribuem-se principalmente em áreas de campo rupestre em Minas Gerais, Bahia, Goiás e estados vizinhos e algumas em ambientes de restingas (DAVID et al., 2001).

A espécie *Eriope blanchetii* são de livre ocorrência em áreas abertas e expostas à insolação durante o dia em ambientes de restingas. Na vegetação os arbustos emergentes costumam-se localizar em áreas centrais das manchas de vegetação com distâncias próximas, entre outras plantas ou entre si de 0,5 a 3,0 m ou mais distantes e isoladas com 10 a 20 m. A altura varia entre 0,5 e 4,3 m, sendo que a maioria das plantas em idade reprodutiva tem de 0,7 a 2,7 m (OLIVEIRA; VIANA; PIGOZZO, 2007).

Na Mata Atlântica pode ser encontrado um desses indivíduos *E. blanchetii* (Figura 1) em restingas no clima tropical do parque metropolitano de Salvador-Bahia (DAVID et al., 2001). O ambiente restinga abrange grande parte do litoral brasileiro nordeste, com áreas de planícies litorâneas e marcada por fatores ambientais como elevadas temperaturas, grande luminosidade, alta salinidade e solos arenosos (LIMA, 2009; NEVES; CONCEIÇÃO, 2010).



Figura 1. Espécime de *E. blanchetii* encontrado em Restinga da Lagoa do Abaeté, Salvador-BA. Foto: Hugo N. Brandão. Fonte: (LIMA, 2009).

Com ocorrência nativa em dunas do Abaeté, a *E. blanchetii* se distribui de forma aleatória pela vasta riqueza de espécies vegetais em protegidas pelo Sistema Nacional de Unidade de Conservação (SNUC) através do Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos (INEMA). Dos poucos estudos encontrados, desde a descoberta e caracterização botânica, por Harley em meados de 1985, a espécie *E. blanchetii* tem-se destacado a partir de 2001 como planta medicinal contendo compostos bioativos com propriedades farmacológicas para tratamento de algumas doenças degenerativas, tal como o Mal de Alzheimer e de Parkinson (DAVID et al., 2001; NEVES; CONCEIÇÃO, 2010).

Apesar dos esforços para proteção ambiental, segundo os dados fornecidos, desde do ano de 2012 o Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFlora) classificou a *E. blanchetii* como ainda vulnerável a extinção (Figura 2). Portanto, estudos com produtos naturais devem ser desenvolvidos a fim de contribuir com o conhecimento químico dessa espécie.

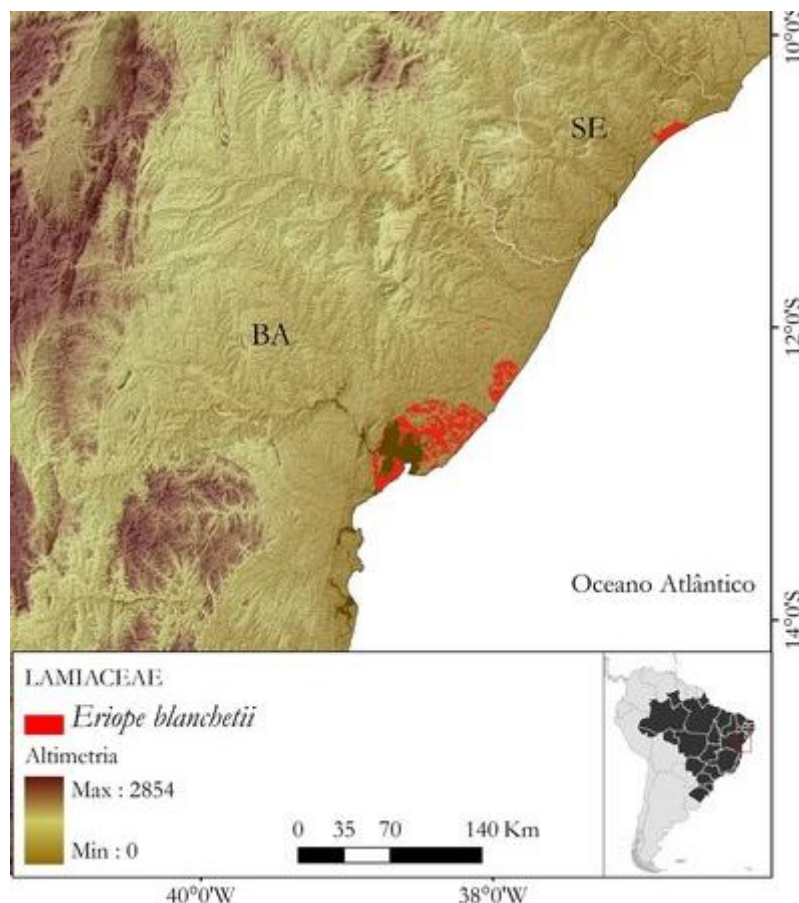


Figura 2. Distribuição de espécimes *E. blanchetii* (Lamiaceae) Fonte: CNCFlora avaliado por Maria Marta V. de Moraes, revisado por Miguel d'Avila de Moraes. Data: 04-04-2012.

Alguns compostos fenólicos foram isolados (Figura 3) em extratos orgânicos de folhas e caule de *E. blanchetii* entre 2001 e 2008, sendo relatados as substâncias lignanas: (α , β -peltatinas) e o flavonóide Quercetina 3-*O*- β -D-glicopiranosídeo. Em 2009, foi isolado o ácido rosmarínico (DAVID et al., 2001; LIMA, 2009; SANTOS et al., 2011).

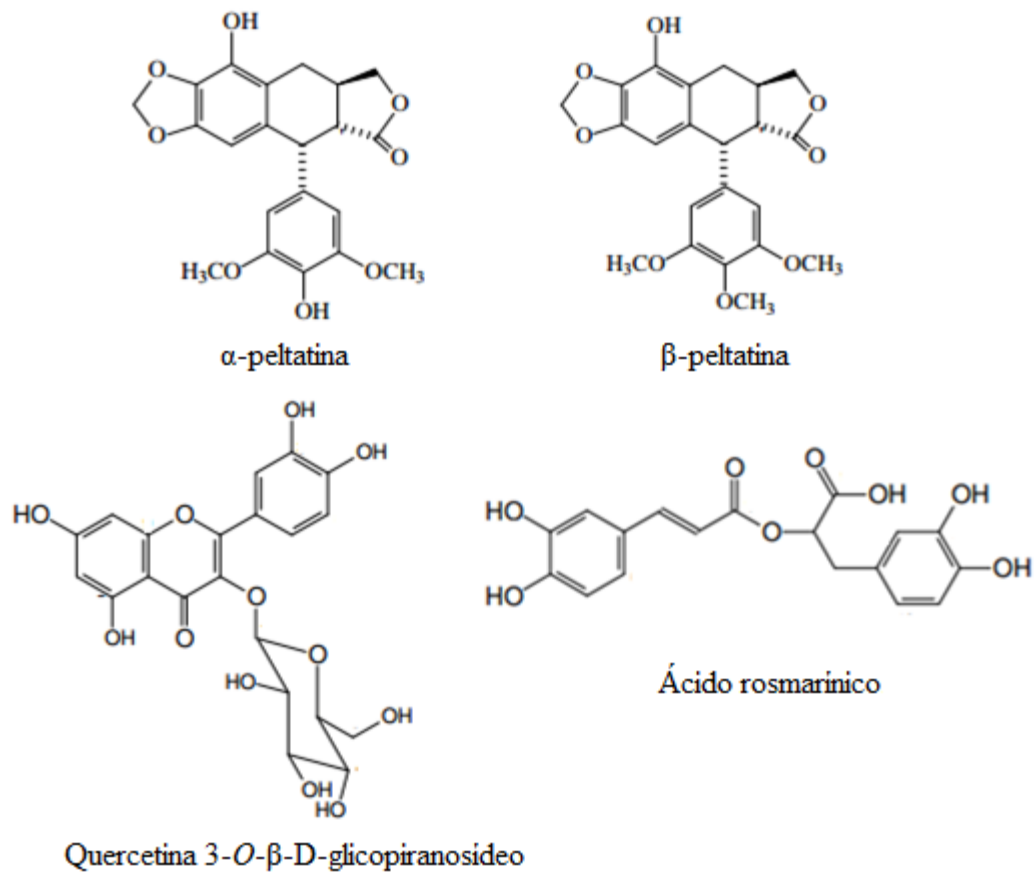


Figura 3. Substâncias fenólicas isoladas em extratos orgânicos de *E. blanchetii*. Fonte: tese de Doutorado (LIMA, 2009).

3.2. Compostos fenólicos

De acordo com Coelho (2014) os compostos fenólicos são moléculas formadas durante o desenvolvimento da planta sendo fundamentais no mecanismo de proteção contra a radiação ultravioleta e agressão de agentes patógenos. Sua estrutura básica consiste de uma ou várias hidroxilas ligadas a anéis aromáticos. Esses compostos (Tabela 1) são comumente classificados de acordo com o número de fenóis e demais grupos presentes sua composição estrutural (COELHO, 2014).

Tabela 1. Classificação geral de compostos fenólicos principais de acordo com sua estrutura química básica e classes pertencentes.

Estrutura básica	Classes
C6	Fenólicos simples
C6-C1	Ácidos fenólicos e compostos relacionados
C6-C2	Ácidos fenilacéticos e acetofenonas
C6-C3	Ácidos cinâmicos, hidroxicinâmicos, cinâmil aldeídos, cinâmil álcoois
C6-C3	Cumarinas, isocumarinas e chalconas
C6-C6 até C15	Ésteres fenólicos, Chalconas, auronas, lignanas
Superiores	Polifenóis, resinas fenólicas, glicosídeos fenólicos, etc.

Obs.: C6 =presença de um anel aromático, C15 =presença de mais de um anel aromático.

Os compostos fenólicos podem ser encontrado na forma livre ou glicosilada (Figura 4), tal como o derivado ácido gálico, encontrado a forma de pentagaloglicose (DEWICK, 2002).

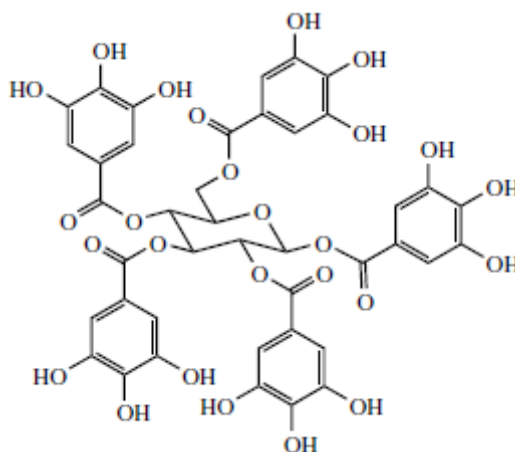


Figura 4. Pentagaloglicose; forma glicosilada composta de 5 ácidos gálicos ligados na molécula de glicose. Imagem obtida e adaptada (DEWICK, 2002).

Os ácidos fenólicos apresentam diversas propriedades antioxidantes no combate de radicais livres (SOARES, 2002). Naturalmente são biossintetizados em espécies vegetais de duas formas estruturais básicas de ácidos: hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos (Figura 5).

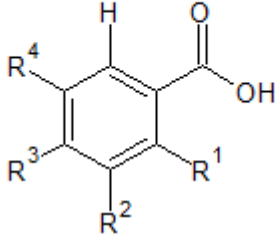
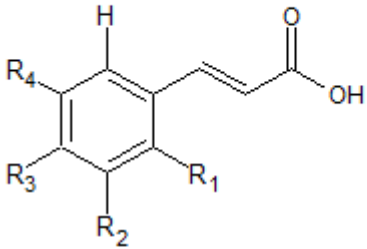
Ácido hidroxibenzoico					Ácido hidroxicinâmico				
									
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ácido benzoico	H	H	H	H	Ácido cinâmico	H	H	H	H
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	H	H	OH	H	Ácido <i>o</i> -hidroxicinâmico	OH	H	H	H
Ácido salicílico	OH	H	H	H	Ácido <i>m</i> -hidroxicinâmico	H	OH	H	H
Ácido protocatecuico	H	OH	OH	H	Ácido <i>p</i> -hidroxicinâmico	H	H	OH	H
Ácido gálico	H	OH	OH	OH	Ácido cafeico	H	OH	OH	H

Figura 5. Alguns exemplos estruturais de ácidos fenólicos comuns como compostos fenólicos. Fonte: (COELHO, 2014; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996)

A biossíntese desses tipos de ácidos fenólicos são comuns em espécies vegetais pertencentes a família Lamiaceae podendo ocorrer reações de esterificação e originar derivados ésteres de ácidos fenólicos (ou ácido clorogênicos, tal como o ácido rosmarínico) Lamiaceae (LAFAY; GIL-IZQUIERDO, 2008).

3.3. Biossíntese de ácidos fenólicos e compostos derivados

O estudo da biossíntese de compostos fenólicos é uma importante etapa investigativa para compreender a produção dos metabólitos na espécie *E. blanchetii*. Os ácidos hidroxicinâmicos são ácidos fenólicos originados via rota do ácido chiquímico, sendo necessário a presença de fenilalanina e tirosina (precursores imediatos, Figura 6). Conseqüentemente, a concentração de ácidos hidroxicinâmicos em tecidos vegetais dependem da quantidade desses precursores, devendo também considerar fatores genéticos, quimiotaxonômicos, influências externas tais como: variações climáticas, estresse na presença de outros organismos vivos, e outros.

Inicialmente a planta produz os açúcares, tal como a glicose, pelo processo de fotossíntese e pela presença de enzimas. Os fosfatos de fosfoenolpiruvato (PEP) e eritrose-4-fosfato (Figura 7) formam a 3-desoxi-arabinoheptulsonato-7-fosfato (DAHP). Posteriormente de forma simultânea, a enzima dinucleótido de nicotinamida (NAD) promove o rearranjo e a ciclização para formar o ácido 3,4-dihidroxiquinico e outras substâncias cíclicas hidroxiladas. Em seguida é originado os ácidos fenólicos simples do tipo ácidos hidroxibenzóicos: ácido *m,p*-diidroxibenzóico ou ácido gálico (DEWICK, 2002).

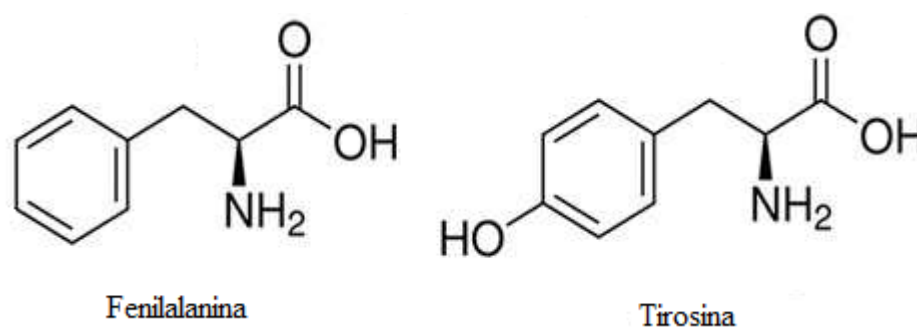


Figura 6. Substâncias precursoras de ácidos fenólicos: fenilalanina e tirosina.

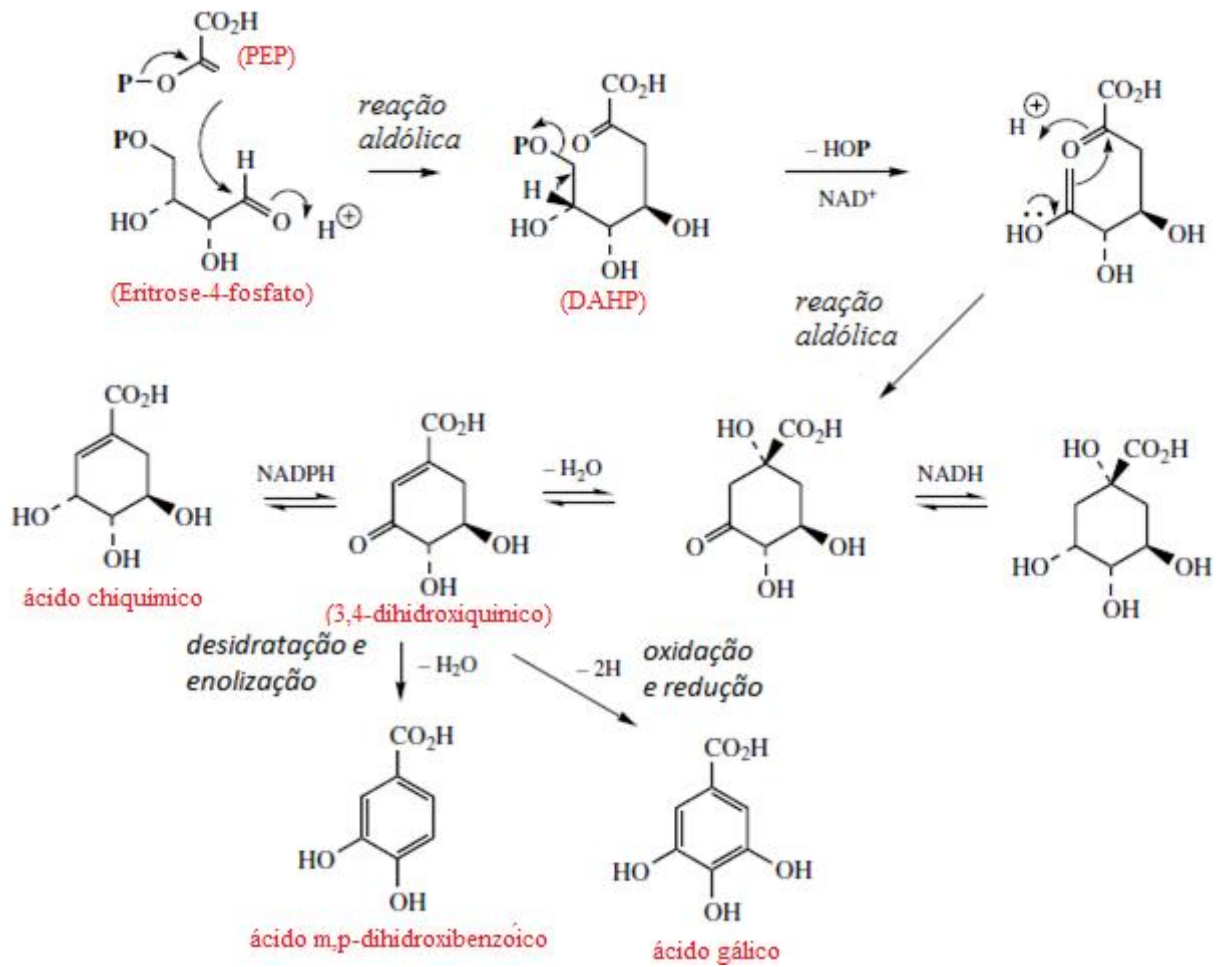


Figura 7. Rota biosintética do ácido hidroxibenzoicos a partir de derivados fosfopiruvatos e triosefosfatos. Imagem obtida e adaptada (DEWICK, 2002).

Pode ocorrer a desidratação do ácido 3,4-diidroxiquinico levando a formação do ácido *m,p*-diidroxi benzóico e ácido gálico bem como a formação do ácido chiquímico na presença do nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) que promove uma redução.

Na Figura 8 é demonstrado a reação de ácido chiquímico com trifosfato de adenosina (ATP) seguido de ataque nucleofílico de PEP com a eliminação de íons ácidos fosfóricos e formação do ácido corísmico (DEWICK, 2002).

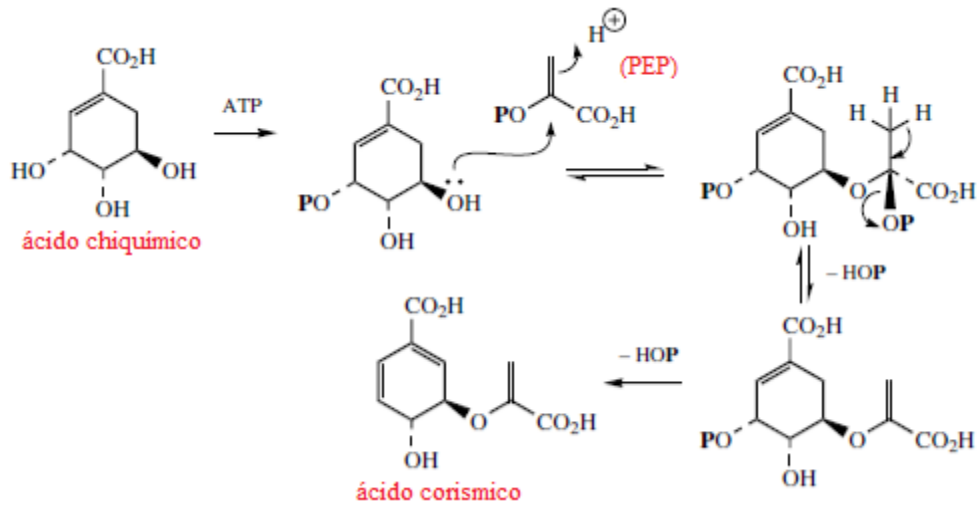


Figura 8. Biossíntese de conversão do ácido chiquímico em ácido corísmico (DEWICK, 2002).

Com rearranjo estrutural do ácido corísmico (Figura 9) ocorre a formação de derivados ácidos pirúvicos. Esses ao reagir com piridoxal 5-fosfato (PLP) leva a formação de aminoácidos *L*-fenilalanina e *L*-tirosina (DEWICK, 2002).

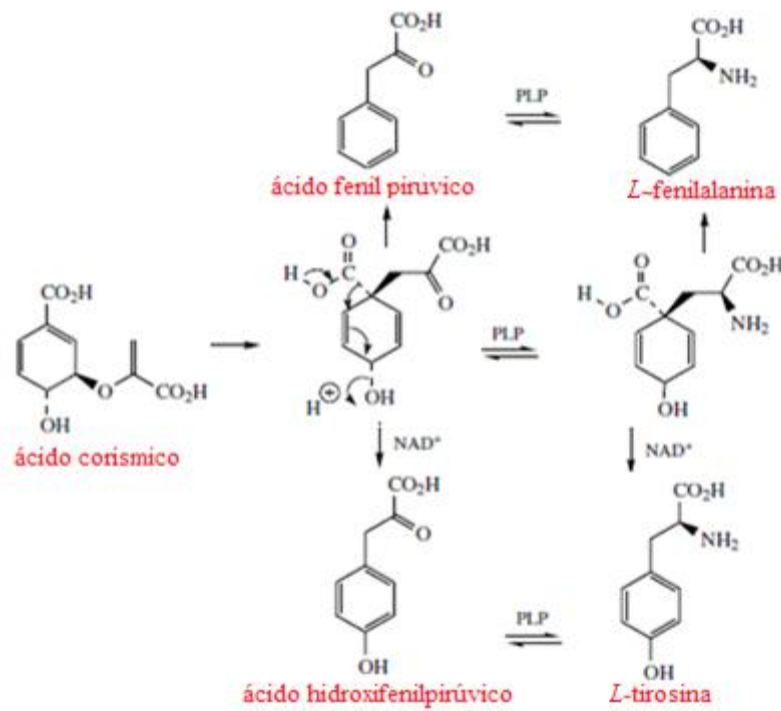


Figura 9. Rotas mistas de formação de ácidos hidroxicinâmicos (DEWICK, 2002).

Os aminoácidos *L*-tirosina e *L*-fenilalanina e derivados ácidos pirúvicos, em presença de enzimas, originam estruturas de derivados cinâmicos ou hidroxicinâmicos. Em alguns casos de biossíntese podem ocorrer combinações de derivados hidroxicinâmicos para originar ésteres de ácidos fenólicos, tal como o ácido rosmarínico (Figura 10), que é também denominado composto polifenólico (KIM et al., 2015).

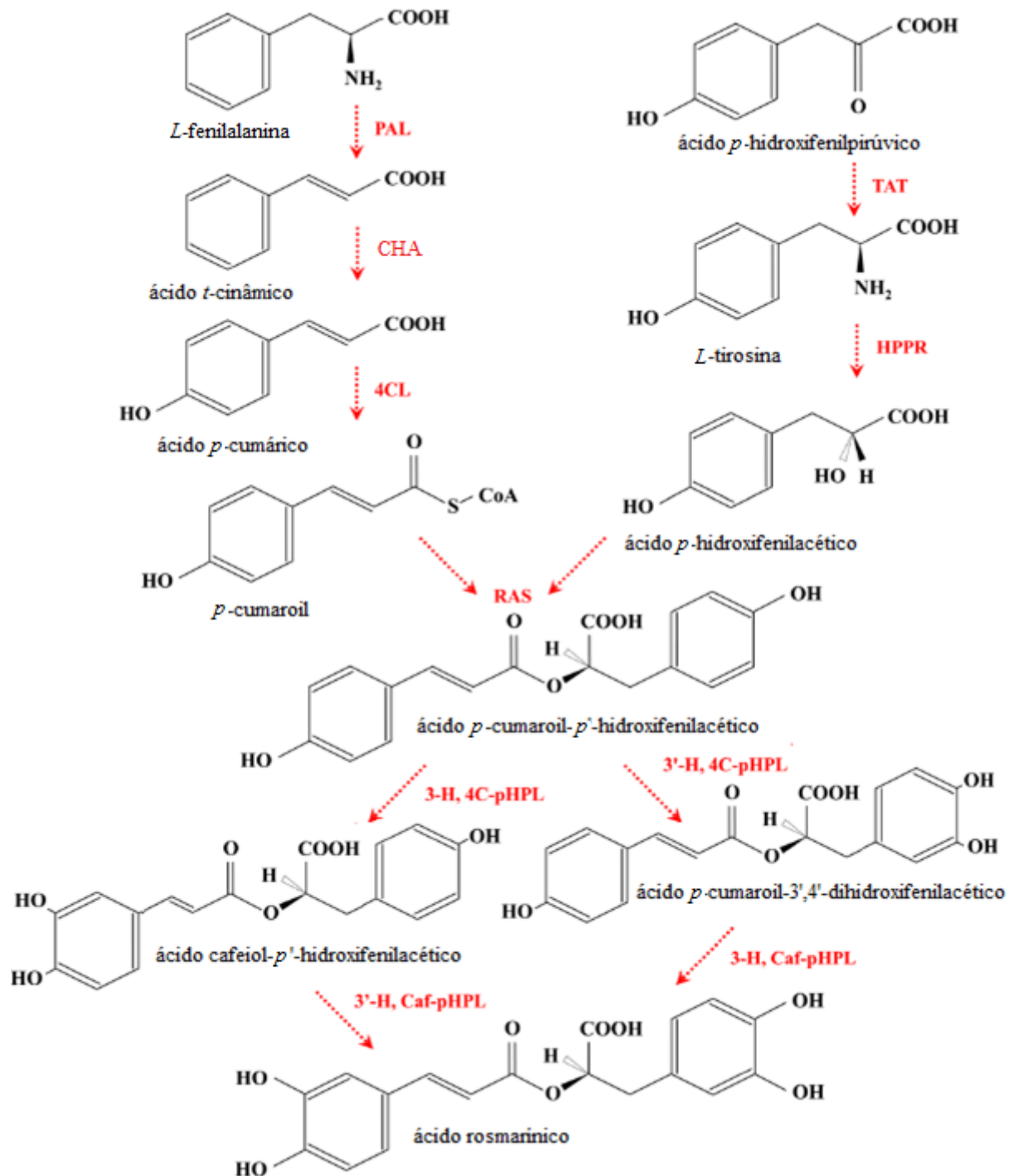


Figura 10. Rota de biossíntese do ácido rosmarínico a partir de processos enzimáticos de esterificação de ácidos hidroxicinâmicos (KIM et al., 2015).

No caso da biossíntese do ácido rosmarínico diversas enzimas contribuem para formação a partir do aminoácido *L*-fenilalanina e ácido *p*-hidroxifenilpirúvico, tais como: fenilalanina de amônia liase (PAL), ácido cinâmico 4-hidroxilase (CHA); ácido 4-cumarico-CoAcetil-ligase (4CL); Tirosina aminotransferase (TAT), hidroxifenilpiruvato redutase (HPPR); ácido rosmarínico sintase (RAS), hidroxicinamioli-CoA-hidroxifenilacetato hidroxicinamoil transferase (3-H e 3'-H,4C-pHPL) e cafeioil- 4'hidroxifenilacetato 3/3'-hidroxilase (3-H e 3'-H, Caf-pHPL). Análogo a biossíntese do ácido rosmarínico outras substâncias fenólicas derivados de ésteres de ácidos hidroxicinâmicos podem ser explicadas (KIM et al., 2015).

Alguns autores denominam derivados ésteres de ácidos fenólicos como ácidos clorogênicos ou como derivados de ácidos cumáricos (MIRA et al., 2008; OLIVEIRA; BASTOS, 2011; SOARES, 2002). Nesse trabalho o ácido rosmarínico é classificado como ésteres de ácidos fenólicos do tipo hidroxicinâmicos.

3.4. Avaliação biológica

Vários compostos fenólicos apresentam propriedades biológicas do tipo antioxidante, antimicrobiana, antiviral e entre outras. Essas avaliações podem ser feitas em extratos ou com substâncias isoladas de espécies vegetais e vários são os testes que podem indicar atividade biológica. Nesse trabalho foram testados letalidade de extratos frente a *Artemia salina*, atividade antioxidante e teste de inibição de enzima acetilcolinesterase.

3.4.1. Letalidade frente a *Artemia salina*

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos de substâncias para estimar concentrações letais que possa ter atividade biológica como antimicrobiana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e outros. Vários métodos podem ser empregados para avaliação de toxicidade em que podem ser do tipo “*in vivo*”, em que a análise é realizada pelo uso de substâncias em organismos vivos, ou “*in vitro*”, em que a análise ocorre por métodos não vivos. Os estudos “*in vivo*” abordam ensaios de toxicidade aguda, subcrônica e crônica avaliando mutagenicidade, embriofetotoxicidade, alterações de fertilidade, carcinogenicidade, e indução de dependência. Já os estudos “*in vitro*” são comumente realizado com bactérias, fungos, algas, crustáceos e outros para fins estimativos de toxicidade como método de triagem.

Alguns trabalhos demonstram a realização de bioensaio frente a *Artemia salina* como método qualitativo aceitável para triagem de toxicidade. Há relatos de trabalhos empregados para a análise e avaliação de resíduos de pesticidas, micotoxinas, poluentes, óleos tóxicos e intoxicação de ambiente marinho, isto através de avaliação de inibição da eclosão dos ovos ou monitoramento de quantitativo de indivíduos mortos. Os ovos *A. salina* podem ser comercialmente acessível em lojas de aquários e peixes ornamentais (MEYER et al., 1982).

O método de letalidade com *Artemia salina* é proposto como um simples bioensaio para pesquisa preliminar de atividade biológica de produtos naturais em estimar a concentração letal (CL_{50}) de indivíduos vivos em meio salino. Essas concentrações podem indicar fraca ou inatividade biológica para $CL_{50} > 1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, forte atividade para $CL_{50} \leq 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e mediamente ativo quando $CL_{50} \geq 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (DAVID et al., 2001; MEYER et al., 1982).

3.4.2. Atividade antioxidante

Pela definição geral, as substâncias antioxidantes são moléculas capazes de retardar ou cessar a oxidação de outras moléculas ocasionados pela presença de radicais livres. As substâncias podem ser de origem exógenas, que pode ser obtidos por plantas, ou endógenas, produzidas pelo próprio organismo vivo. Os radicais livres são um dos problemas responsáveis por surgimento de doenças degenerativas no mundo comuns durante o envelhecimento do ser humano associado a fatores genéticos, alimentícios e outros. Os radicais livres podem ser classificados como substâncias, que contém um ou mais elétrons desemparelhados, sendo espécies químicas do tipo hidroxilados ou nitrogenados (NIMSE; PAL, 2015).

Os radicais livres e oxidantes mais comuns estão presentes em organismos vivos nas formas de radicais hidroxilados: o ânion hidroxila (HO^-), o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl), e radicais nitrogenados, tais como: óxido nítrico (NO^-) e óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), ânion nitrito (NO_2^-), ânion nitrato (NO_3^-) e ânion peroxinitrito (ONOO^-) (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Uma das mais importantes fontes naturais de antioxidantes são as plantas e os fungos. Além disso as substâncias antioxidantes naturais podem ser categorizadas como enzimática e não enzimática ou quanto a forma de ações antioxidantes denominados de “scavenger”, quando atua sequestrando os radicais livres, e “quencher”, quando extingam os radicais livres. As substâncias antioxidantes enzimáticas funcionam como agentes de quebra e remoção de moléculas contendo radicais livres oxigenados porque são importantes agentes conversores de produtos oxidativos perigosos, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em água em presença de metais cofatores de cobre, zinco, manganês e ferro. As substâncias antioxidantes não enzimáticas agem interrompendo o processo de reação em cadeia de radicais livres por meio de sequestro de substâncias oxidantes, tal como a ação do ácido ascórbico (NIMSE; PAL, 2015).

Os compostos fenólicos classificados como substâncias antioxidantes não enzimáticos e de ação “scavengers” enquadram-se nesse estudo, os derivados ácidos e não ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. Nesse caso, as propriedades antioxidantes podem ser por processo de captura de elétrons devido a presença de grupos hidroxilas ligados no anel aromático aumentando ou diminuindo o efeito abandonador de hidrogênios ácidos seguido de estabilização por ressonâncias. Normalmente os ácidos fenólicos hidroxicinâmicos tendem a ser melhores antioxidante do que os ácidos hidroxibenzóicos devido a presença de grupo cinâmico aumentar o potencial antioxidante (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

A propriedade de captura de elétrons por grupos ácidos (Figura 11) depende do efeito indutor ou abandonador de hidrogênios ácidos influenciado pela presença de hidroxilas ligados ao anel aromático para promover potencial antioxidante. No caso da presença do grupo *o*-diidroxil no anel aromático (ácido cafeico) ocorre o aumento do efeito abandonador de hidrogênio ácido e conseqüentemente, aumento da força de atividade antioxidante comparado ao grupo *o*-hidroxil no anel aromático do ácido *o*-hidroxicinâmico (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

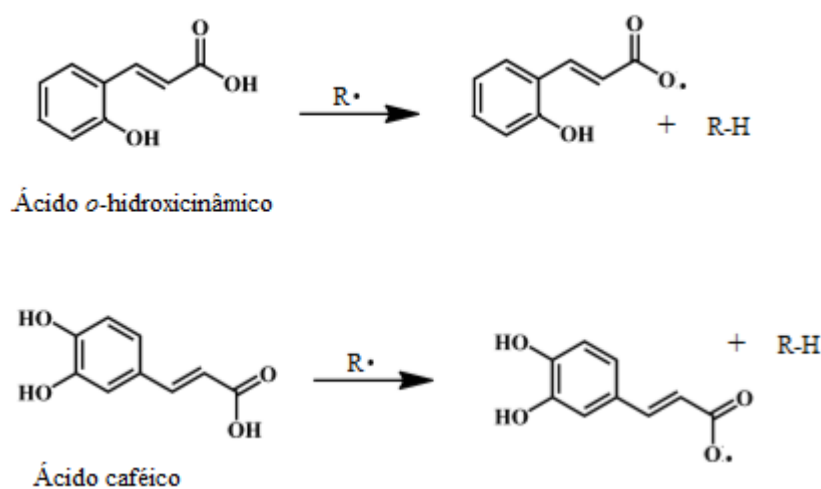


Figura 11. Ação antioxidante "scavenger" de ácidos *o*-hidroxicinâmicos e cafeico e seus respectivos Índices de Atividade Antioxidante (IAA) (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996)

Essa propriedade de captura de radicais livres e ressonância pode ser observada em derivados ésteres de ácidos hidroxicinâmicos, tal como o ácido rosmarínico (Figura 12) em seu papel antioxidante ocorre durante o sequestro de radicais livres seguido de liberação de hidrogênio ácido vizinho ao grupo éster com estabilização por rearranjos ou ressonâncias (NIMSE; PAL, 2015).

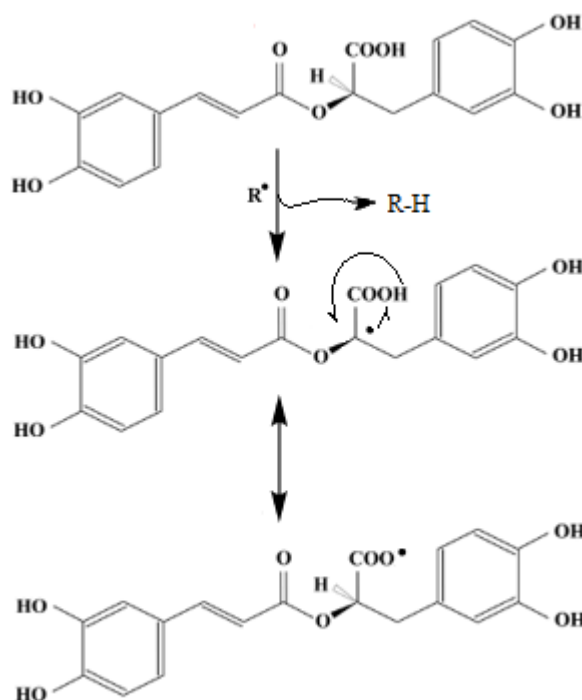


Figura 12. Propriedade antioxidante ácido rosmarínico na captura de radical livre (R•) e estabilização por ressonância em derivados ésteres de ácidos hidroxicinâmicos. Fonte: (NIMSE; PAL, 2015)

Diversos estudos apontam os ácidos hidroxicinâmicos como substâncias antioxidantes benéficas à saúde obtidos em fontes naturais. No caso da *E. blanchetii* em um estudo realizado por Lima (2009) mostrou que o ácido rosmarínico apresentou propriedade antioxidante com CE_{50} de $92,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto que o BHT, nesse experimento, apresentou CE_{50} de $44,7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.4.3. Atividade acetilcolinesterase

Alguns autores acreditam que o surgimento de doenças durante o envelhecimento humano são ocasionadas por acúmulo de radicais livres que induz alterações fisiológicas e genéticas causando câncer ou enzimas degenerativas (MORAIS et al., 2013). Diante disso, segundo a associação brasileira de Alzheimer (ABRAZ), estima-se que existam no mundo cerca de 35,6 milhões de pessoas com a mal de Alzheimer (MA). No Brasil, há cerca de 1,2 milhão de casos, a maior parte deles ainda sem diagnóstico e nos pacientes diagnosticados cerca de 30% são idosos a partir de 80 anos (MEDEIROS et al., 2016).

Estudos recentes em pacientes com MA indicam como diagnóstico dessa doença a determinação de níveis elevados da enzima acetilcolinesterase (AChE) que são agentes de degradação de neurônios saudáveis responsáveis por funções cognitivas importantes como forma de pensar, aprender e memorizar. Atualmente umas das formas de tratamento de MA é o uso de compostos bioativos com propriedades inibidores colinesterásicos denominados de anticolinesterásicos, representados na Figura 13, a galantanina, a tacrina, rivastigmina e fisostigmina (FEITOSA, 2015).

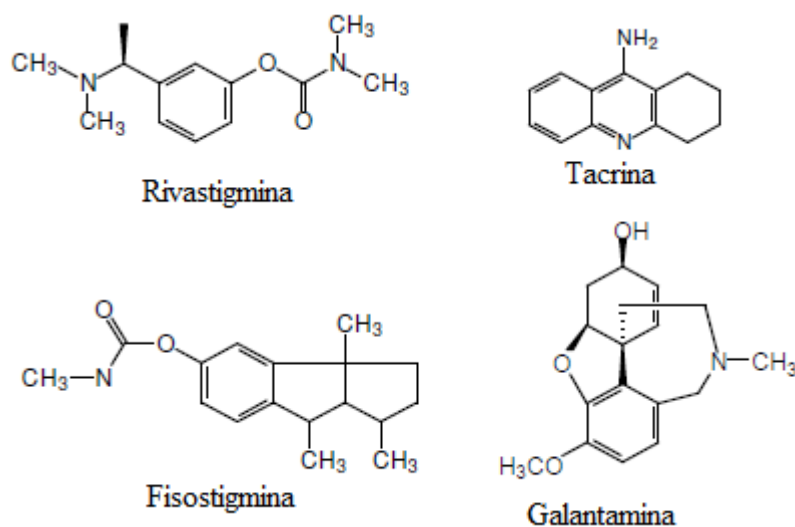


Figura 13. Algumas das substâncias utilizadas comercialmente no tratamento de mal de Alzheimer, segundo Feitosa (2015), com baixos efeitos colaterais.

Atualmente todos remédios para tratamento de mal de Alzheimer possuem efeitos colaterais. Dentre eles, a galantamina é o mais indicado como fármaco inibidor acetilcolinestásico que em super dosagens acarreta problemas gastrointestinais. Efeitos indesejáveis são frequentemente observados em rivastigmina (Exelon[®]) que acarreta também problemas gastrointestinais e nervosos, a tacrina (Cognex[®]) como substância hepatóxica e a fisostigmina (Synapton[®]) como substância depressiva forte (FEITOSA, 2015)

Segundo Feitosa (2015), os efeitos indesejáveis de uso frequente desses fármacos acarretam ao longo do tempo, o aumento de radicais livres oxigenados e nitrogenados promovendo aumento de quantidade de fagócitos e diminuição de imunidade durante o tratamento de MA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Para minimizar os efeitos adversos do uso dessas substâncias comerciais, é necessário incentivo à pesquisa, desenvolvimento de modelos farmacológicos e busca de substâncias, que além de atividade inibitória AChE contribuem para a diminuição de efeitos colaterais como diminuição de radicais livres e toxicidade.

3.5.Extração de substâncias fenólicas

De acordo com a literatura a extração de substâncias fenólicas pode ser realizada por maceração, digestão e infusão (FORIM et al., 2010). São métodos de extração sólido-líquido no qual baseia-se na interação química de forças intermoleculares do solvente em retirar as substâncias contidas numa amostra vegetal. A maceração é normalmente realizado em temperatura ambiente (25°C em condições normais no nível do mar a 1Atm) e pode ser realizado em sistema fechado (livre de fatores externos) ou sistema aberto (sujeito a influência de fatores externos como o ar, poeira, umidade e outros). Na infusão utiliza-se como solvente, a água fervente sob fonte de calor e posteriormente na adição de amostra em temperatura ambiente e suspensão de fonte de calor ocorre a extração por variação de temperatura de forma gradual e decrescente (HELENO et al., 2015). Na técnica de digestão é comumente realizado em sistema fechado com o uso de solventes em temperatura controlada e superiores de 25°C.

As diferentes técnicas de extração têm suas vantagens e desvantagens, conforme as características das diferentes matrizes de amostras. O método de infusão e digestão extrai fenólicos estáveis a temperaturas superiores a 25°C e além de outras substâncias como polifenóis, carboidratos e outros concomitantes que podem influenciar na qualidade do extrato. Para obtenção de compostos fenólicos o método de maceração é o mais indicado podendo ser realizado de forma exaustiva, ou seja repetidas vezes (MOORES; DOROTHY; WOOD, 1948).

A técnica de extração por maceração permite através de uso de solventes orgânicos em extrair e concentrar extratos por meio de uso de rotaevaporadores em temperaturas abaixo de 60 °C comumente estáveis na obtenção de ácidos hidroxicinâmicos e derivados (DEWICK, 2002; MOORES; DOROTHY; WOOD, 1948). Sendo assim, pode-se utilizar diversos solventes polares para extração de compostos fenólicos, tais como metanol, etanol, acetato de etila, clorofórmio e outros.

Esses solventes podem ser utilizados também na forma de misturas objetivando maximizar a extração de compostos fenólicos. Um dos estudos mais empregados é a avaliação de planejamento *simplex* de misturas em é empregado para otimização de proporções de misturas de solventes para extração de compostos fenólicos que varia por tipo de matriz de amostra vegetal, tal como a amostra de soja foi determinado a mistura binária de água e etanol (volume 1:1) como mistura otimizada (HANDA et al., 2016).

3.5.1. Estudo de misturas para otimização de extração

A otimização de qualquer experimento depende do estudo de variáveis dependentes e independentes que tem como objetivo maximizar ou minimizar uma resposta (fator resposta) em relação à variável controle. A variável independente corresponde às medidas que não dependem de outra medida enquanto que a variável dependente é a medida que depende de uma ou mais variáveis independentes. Tendo como exemplo uma função $f(x, y, z) = x + y + z$, interpreta-se $f(x, y, z)$ como resultado obtido na forma de medida que dependem das medidas de x , y e z , ou seja, valor de $f(x, y, z)$ é uma variável dependente enquanto que x , y e z são variáveis independentes. Já a variável controle corresponde ao ajuste de medidas de x , y e z para obtenção de medida intermediária de $f(x, y, z)$ que não seja nem mínimo e nem máximo como fator resposta (SCHEFFE, 1963).

Dentre diversos tipos de estudo de variáveis, um dos mais empregados para estudo de misturas de solventes é o planejamento simplex que podem ser do tipo *lattice* ou *centroide*. os planejamentos *simplex-lattice* e *simplex-centroide* são empregados para avaliar diferentes proporções de mistura de componentes, sendo que no primeiro é ideal para estudo de misturas com mais de 3 componentes ($n > 3$) enquanto que o segundo é suficiente para explicar os fenômenos de misturas com até 3 componentes. Ambos os planejamentos *simplex* servem para demonstrar efeitos de neutralidade, de sinergismo ou antagonismo que podem ser ocasionados pelas proporções de variáveis independentes (SCHEFFE, 1963).

Em muitos trabalhos envolvendo estudos de planejamento *simplex* têm-se observado o uso do tipo *centroide* para explicar de forma satisfatória qual a melhor proporção de misturas. Sendo necessário testar os modelos matemáticos teóricos que podem ser: linear, quadrático ou cúbico especial. No caso de extração de compostos fenólicos, o uso de diferentes solventes e suas misturas devem ser submetidos a testes de validação para determinar o modelo matemático adequado para avaliação *simplex centroide* (HANDA et al., 2016; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; SCHEFFE, 1963).

3.5.2. Modelos matemáticos de misturas

No caso de estudos de misturas de componentes, o fator resposta depende da variável composição, que pode ser denominado de $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$. De acordo Sheffe (1963) a equação 1 estabelece o número de tratamentos experimentais a ser avaliados pelo planejamento Simplex-centroide, onde o termo q é o número de componentes de misturas.

$$2^{q-1} \tag{1}$$

Através do uso de ferramentas estatísticas computacionais, tal como o software Statistica[®] v. 7.0, pode ser obtido modelos matemáticos tais como: linear (2), quadrático (3) ou cúbico especial (4). Nesses modelos matemáticos, y representa o fator resposta e β os parâmetros estimados.

$$y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_q x_q \tag{2}$$

$$y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} x_i x_j \tag{3}$$

$$y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i < j, k} \sum \beta_{ijk} x_i x_j x_k \tag{4}$$

Para escolha e adequação do modelo matemático do planejamento de mistura de componentes é comumente utilizado o teste de hipóteses para significância da regressão, estimativa de coeficiente de determinação múltipla (R^2 ajustado) e análise de gráfico de resíduos.

- Teste de hipóteses (significância da regressão)

É usado para determinar se existe relação linear entre a resposta y com as variáveis independentes. As hipótese podem ser nula (H_0) e alternativa (H_1), onde $H_0 = \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k$ significa que não existe diferença significativa entre as medidas e que $H_1 = \beta_1 \neq \beta_2 \neq \dots \neq \beta_k$ significa que existe diferença significativa entre as medidas. Quando se tem a H_0 significa que os valores obtidos experimentalmente são próximos dos valores sugeridos pelo modelo matemático.

De forma mais detalhada o teste de hipótese pode ser melhor avaliado pela análise de variância (ANOVA) que são sumarizados normalmente conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Análise de variância para significância de um modelo matemático *simplex-centroide*

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	media quadrada	F°
Regressão	SS_R	p	$MS_R = SS_R / p$	MS_R / MS_E
Resíduos	SS_E	$N - p - 1$	$MS_E = SS_E / (N - p - 1)$	
Total	SS_Y	$N - 1$		

Onde: SS_R é a soma dos quadrados dos valores fornecidos pelo modelo de regressão

SS_E é a soma dos quadrados dos resíduos

SS_T é a soma dos valores observados

N é o número de observações

p é o número de parâmetros estimados no modelo

- Estimativa R^2 ajustado

O cálculo do coeficiente de determinação múltipla (R^2) indica o valor da redução na variabilidade da resposta obtida pelo uso das variáveis regressoras. De acordo com as equações 5 e 6, R^2 deve variar entre valores 0 e 1.

$$R^2 = SS_R / SS_Y = 1 - (SS_E / SS_Y) \quad (5)$$

$$SS_Y = SS_R + SS_E \quad (6)$$

- Análise de gráfico de resíduos

Os resíduos do modelo de regressão múltipla são calculado por $r_i = y_i - y_m$, onde y_i é o valor experimental e y_m é o valor sugerido pelo modelo matemático. Frequentemente são plotados em papel de probabilidade normal, versus cada variável independente, versus y_m ou na sequência de realização de tratamentos (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Esses gráficos, quando plotados por um software, permitem detectar desvios das medidas experimentais como normalidades do erro experimental, pontos fora da tendência dos demais (*outliers*), tendências na variância, e a especificação funcional incorreta para uma variável independente.

3.5.3. Delimitação *simplex-centroide*

A análise de superfície de resposta baseia-se de um modelo matemático ajustado e consistente experimentalmente. Normalmente é utilizado ferramentas estatísticas para plotagem de região otimizada ou como delimitação *simplex-centroide* representado por sinalizações visuais na superfície da área de um triângulo equilátero (Figura 14).

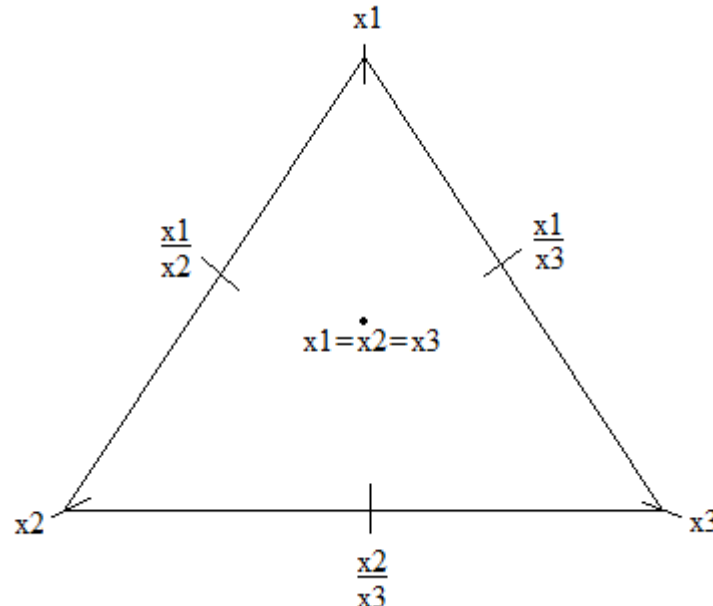


Figura 14. Representação espacial do planejamento simplex-centroide de componentes x_1 , x_2 e x_3 para análise de designer de interações dos componentes indicado em 7 posições do triângulo equilátero. Fonte: autoria própria.

Para a avaliar 3 componentes ($q=3$), o número de tratamentos mínimos deve ser igual a sete, logo o triângulo equilátero terá 7 posições que indicará o fator resposta maximizado ou minimizado. Na figura 14, as arestas do triângulo representa os componentes isolados x_1 , x_2 e x_3 , os lados do triângulos as misturas binárias de componentes (x_1 com x_2 , x_1 com x_3 , e x_2 com x_3) e o ponto central (controle) na superfície do triângulo como a mistura ternária de componentes (x_1 com x_2 com x_3).

Outra forma de avaliar a mistura é a análise de pseudo misturas com padronização de região otimizada em que através de um software estatístico, tal como Statistica v. 7, pode-se plotar, de acordo com o modelo matemático de misturas validados, plotar e visualizar os efeitos individuais de componentes na mistura (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Quando os perfis gráficos de componentes se sobrepõe com tendência ao aumento de fator resposta que indicará na mistura, o efeito de sinergismo, enquanto que, se ocorrer a diminuição de fator resposta indicará efeito de antagonismo na mistura. Na Figura 15 tem-se a representação hipotética de pseudo misturas em que os 3 componentes exibem efeitos desejáveis (linha preta) e indesejáveis (cor vermelha) em relação à maximização de fator resposta.

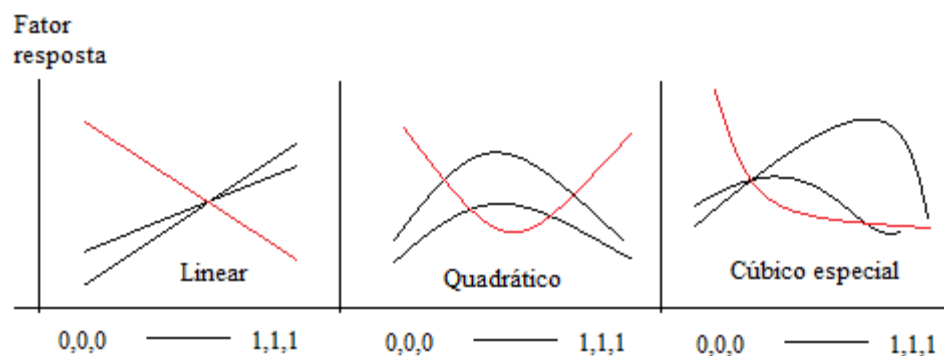


Figura 15. Exemplo hipotético de análise de pseudo misturas de 3 componentes (x_1, x_2, x_3) em região otimizada. Linha vermelha efeito antagônico e linha preta de sinergismo. Composição de misturas entre 0 e 1 para cada componente.

4. METODOLOGIAS

4.1. Coleta e identificação de material vegetal

As espécimes de *E. blanchetii* foram coletadas de forma aleatória, em 20 de fevereiro de 2015, nos arredores de dunas e restingas, localizado no parque Metropolitano da lagoa de Abaeté, no bairro Itapuã em Salvador - Ba. Foi identificado e registrado pela botânica Profa. Dra. Maria Lenise Guedes do Departamento de Biologia da Universidade Federal da Bahia com depósito localizado no Herbário Alexandre Leal Costa do Instituto de Biologia da UFBA sob o n° 045599.

Após a coleta as folhas, partes aéreas e casca de *E. blanchetii* foram separadas e posteriormente secas em estufa, modelo SL – 102, marca SOLAB, entre 35 e 40 °C. Posteriormente, as amostras secas foram trituradas no moinho de facas do tipo Wiley no tamanho de 2,0 mm e armazenadas em sacos plásticos escuros devidamente fechados até o momento de utilização.

4.2. Equipamentos e reagentes utilizados

- Espectrofotômetro Nova Instruments[®], modelo UV1600
- Espectrofotômetro Thermo Science[®], modelo Multiskan Go
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência Shimadzu[®], modelo DGU-20A3R
- Módulo de bomba Shimadzu[®], modelo Nexera LC-20AD XR
- Módulo Shimadzu[®], modelo Prominence CTO- 20^a
- Coluna Shimadzu[®] de fase reversa, modelo VP-ODS-C-18 (150mm x 2mm x 5µm)
- Amostrador automático Shimadzu[®], modelo SIL-20A-XR
- Módulo Shimadzu[®] detector de arranjo de diodos, modelo SPD-M20A
- Módulo de interface Shimadzu[®], modelo CBM-20A
- Reagente Sigma Aldrich[®] Folin & Ciocalteou
- Padrões Sigma Aldrich[®], BHT, DPPH, ácido gálico e ácido rosmarínico
- Padrões Biotec[®], hidrogenocarbonato de sódio e acetato de chumbo II
- Solvente Merck[®], metanol ultra puro
- Solventes Anidrol[®], etanol, acetato de etila e clorofórmio.
- Filtro Milipore[®] 0,45 µm

4.3. Obtenção de extratos orgânicos

4.3.1. Planejamento de misturas de solventes

No procedimento utilizou-se amostras de folhas (F), partes aéreas (P) e caule (C) *E. blanchetii* em que 10 g de cada amostra foram macerados individualmente com 120 mL de solvente. Os solventes foram empregados nas formas puras ou combinadas de etanol (E), acetato de etila (A) e clorofórmio (C) e o processo de maceração foi estático em sistema fechado por 24 h. Para cada maceração foi realizado a filtração a vácuo e concentração do extrato em rotaevaporador a 55°C. O resíduo, foi reutilizado para remaceração por mais 2 vezes consecutivas. Os extratos obtidos foram agrupados e determinado o rendimento de massa de amostra seca utilizada, expressos em teor $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

Para avaliar a mistura de solventes foi proposto uma matriz (Tabela 3) de proporções de E, A e C representado por 7 tipos de tratamentos (experimentos) onde: os volumes de cada solvente variam na razão de 0 a 1 proporcional a quantidades de 0 a 120 mL.

Tabela 3. Planejamento de mistura de solventes a serem empregados na obtenção de extratos orgânicos por maceração exaustiva de folhas (F), parte aéreas (P) e caule (C) *E. blanchetii*.

Tratamento	Proporção de misturas (mL)			Extratos obtidos		
	Etanol	Acetato de etila	Clorofórmio			
1	1(120)	0 (0)	0 (0)	F-E	P-E	C-E
2	0 (0)	1 (120)	0 (0)	F-A	P-A	C-A
3	0 (0)	0 (0)	1 (120)	F-C	P-C	C-C
4	1/2 (60)	1/2 (60)	0 (0)	F-E/A	P-E/A	C-E/A
5	1/2 (60)	0 (0)	1/2 (60)	F-E/C	P-E/C	C-E/C
6	0 (0)	1/2 (60)	1/2 (60)	F-A/C	P-A/C	C-A/C
7	1/3 (40)	1/3 (40)	1/3 (40)	F-E/A/C	P-E/A/C	C-E/A/C

Obs.: Os códigos representados correspondem às variáveis dependentes a serem avaliados como fator resposta quanto às amostras F P e C e os solventes E, A e C empregados.

Inicialmente foi calculado as massas de extratos obtidos e posteriormente avaliou-se o método de mistura de solventes, atribuindo como fator resposta *simplex-centroide* a determinação de teor de fenólicos totais.

4.3.2. Quantificação de fenólicos totais - Método de Folin & Ciocalteu

A determinação de fenólicos totais foi realizado pelo método de Folin & Ciocalteu conforme a metodologia Ruiz et al (2012). Nesse método foram utilizados o espectrofotômetro UV/Vis, solvente metanol (Anidrol[®]), reagente Follin & Ciocalteu e padrão de ácido gálico (Sigma-aldrich[®]).

A curva analítica foi preparada utilizando 500 µL de padrão de ácido gálico em diferentes concentrações equidistantes entre 10 a 60µg·mL⁻¹ adicionados em um tubo de ensaio. Em seguida foram adicionados 500 µL de reagente Folin & Ciocalteu, 1000 µL de solução saturada de NaHCO₃ e 8 mL de H₂O destilada. O branco analítico foi realizado da mesma forma, apenas substituindo a alíquota do padrão por 500 µL de solvente metanol enquanto que na análise dos extratos utilizou-se 500 µL de solução preparada de extratos 1 mg·mL⁻¹.

Cada tubo de ensaio, contendo a mistura reacional, foi revestido com papel alumínio durante um intervalo de 25 min. Posteriormente, para cada tubo foi feito a leitura em 773 nm. Todas a análises dos extratos foram feitas em triplicata com obtenção de média, desvio padrão e coeficiente de variação percentual (CV %) em solvente metanol.

A partir das análises de várias medidas do branco analítico e das concentrações do padrão foram obtidos: Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), equação da regressão linear e coeficiente de determinação (r^2)(THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). O LD e LQ foi determinado conforme as equações 7 e 8, (s) corresponde ao coeficiente angular da curva analítica e (S) ao desvio padrão de 30 sinais do branco analítico.

$$LD = (3,3) \cdot (s/S) \quad (7)$$

$$LQ = 10 \cdot (s/S) \quad (8)$$

4.3.3. Avaliação *simplex-centroide* – Fator resposta

Para a análise de modelos de misturas utilizou-se o software Sattistica[®] v. 7 em que realizou-se a análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos e modelos sugeridos para melhor explicação dos efeitos de misturas e análise gráfica de resíduos de valores preditos e observados como validação de escolha do modelo matemático.

4.4.Determinação de derivados ácidos fenólicos dos extratos otimizados

4.4.1. Análise de ésteres de ácidos fenólicos

Os extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* foram submetidos à determinação espectrofotométrica de ésteres de ácidos fenólicos (também denominados de ácidos clorogênicos) pelo método adaptado Moores e colaboradores (1948) utilizando acetato de chumbo II para seletividade e um padrão de éster de ácido fenólico para obtenção de curva analítica com leitura em 324 nm. Nesse trabalho foi usado o ácido rosmarínico, como padrão.

Para a avaliação de seletividade de ésteres fenólicos foi realizado uma reação de 10 mL de solução aquosa de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de padrão de ácido rosmarínico com 0, 0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 mL de solução saturada de acetato de chumbo II. Posteriormente realizou-se a varredura espectral de 200 a 500 nm no espectrofotômetro da marca Nova Instrumentes, modelo 1600UV, para avaliação da altura de absorvância em 324 nm. Em seguida avaliou-se os extratos de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii*.

Em seguida preparou-se solução mãe de cada extrato otimizado (folhas, partes aéreas e caule) de *E. blanchetii* com 0,010 g de extrato e 20 mL de água destilada em um erlenmeyer de 50 mL. Posteriormente submeteu-se em agitação magnética por 20 min e avaliou-se a absorvância em 324 nm. O preparo de amostras foi feito em triplicata para avaliação de média, desvio padrão e coeficiente de variação percentual (CV%) e a validação desse método foi feita através de fortificação em amostras (RIBANE et al., 2004).

4.4.2. Determinação cromatográfica de ácido rosmarínico

Dos extratos otimizados de *E. blanchetii* foi avaliado somente o extrato que apresentou maior teor de ésteres de ácidos fenólicos, conforme a metodologia de Medrado et al (2017) com adaptação ao preparo de amostras e validação de método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

Esse procedimento foi realizado no Instituto de Química da UFBA no Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais (GPPN) em que foi utilizado o Ultra Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (ultra-CLAE), marca Shimadzu[®] modelo DGU-20A3R, acoplado com sistemas Nexera de duas bombas LC-20AD XR e amostrador automático SIL-20A XR, com módulos Prominence: CTO-20A ligado à coluna VP-ODS C-18 (150mm x 2mm x 5µm), SPD-M20A (Detector de arranjos de diodos-DAD) e CBM-20A (modulo de interface com o computador).

O detector DAD foi programado para escaneamento espectral de 200 á 400 nm e a condição de sistema gradiente de separação empregada foi do tipo binário com fase móvel variável de misturas de solventes metanol (28 à 62%) em água acidificado com 0,1% de ácido acético v/v em 10 min sob fluxo de 0,5 mL·min⁻¹ em temperatura ambiente com injeção automática de 5 µL. Para obtenção de curva analítica de ácidos fenólicos utilizou-se o padrão de ácido rosmarínico (MEDRADO et al., 2017).

O padrão de ácido rosmarínico e a amostra de extrato otimizado de maior teor ésteres de ácidos fenólicos foram preparados individualmente, solubilizando 0,01 g de massa de amostra em solvente metanol ultra puro acidificado com 0,1 % de ácido acético em um balão volumétrico de 10 mL. Posteriormente, as soluções foram filtradas em filtro Milipore[®] de 0,45 µm e 1 mL de amostras foram analisados usando amostrador automático Shimadzu, Nexera SIL-20A XR.

Os padrões e as amostras foram preparados em triplicatas para a validação de parâmetros de análise qualitativa, quanto à seletividade, e quantitativos, tais como: precisão, linearidade da curva analítica, limite de detecção e limite de quantificação (RIBANE et al., 2004). Para a avaliação de seletividade do método comparou-se os tempos de retenção, altura de picos cromatográficos e os espectros dos padrões de ácidos fenólicos e os extratos otimizados de *E. blanchetii*.

4.5. Avaliação biológica dos extratos otimizados

4.5.1. Atividade antioxidante

A avaliação da capacidade dos extratos em sequestrar o radical estável DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) foi realizado conforme a metodologia de Scherer e Godoy (2009) como determinação de atividade antioxidante. Nesse experimento utilizou-se o espectrofotômetro UV-Vis da marca Nova Instruments, modelo NOVA UV1600, solvente metanol (Anidrol[®]), DPPH e BHT (Sigma Aldrich[®]).

A determinação da cinética do DPPH foi realizado a partir da análise de 0,1 mL de solução de extrato em concentrações equidistantes de 68 a 272 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ com 3,9 mL de solução de DPPH a 31,54 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (equivalente 0,08 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Inicialmente foi empregado o extrato otimizado de folhas de *E. blanchetii* e em seguida foi monitorado o tempo de estabilidade de reação com DPPH a 517 nm.

Após a definição do tempo de reação de DPPH obtido através do estudo cinético, foram preparadas soluções metanólicas dos extratos otimizado de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* a 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sendo diluídas em 5 (cinco) concentrações equidistantes de 200 a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para cada solução diluída foi reagido 0,1 mL com 3,9 mL de DPPH. A leitura na determinação do CE_{50} e IAA foi feito em triplicata, a 25°C. Posteriormente, foi realizado regressão linear das diferentes concentrações de extratos reagido com DPPH expressos em absorvância, percentual de sequestro de radicais livres (%SRL) (SCHERER; GODOY, 2009).

O Índice de Atividade Antioxidante (IAA), foi calculado conforme a equação 9, em que CE_{50} corresponde a concentração Efetiva de %SRL equivalente à metade do sinal de absorvância dos pontos equidistantes:

$$\text{IAA} = \frac{[\text{Concentração final de DPPH}] \times (3,9)}{(0,1) \times (\text{CE}_{50})} \quad (9)$$

4.5.2. Letalidade frente *Artemia salina*

O teste de triagem toxicológica dos extratos frente a indivíduos *Artemia salina* foi realizado conforme o método de David et al (2001) com algumas modificações. Os indivíduos de *A. salina* foram obtidos após 48 hrs e eclosão de ovos *Artemia salina*, da marca marama aquacultura, em meio aquoso marinho sob fonte luminosa e incandescente de 40 W. Foi utilizado a água do mar previamente filtrada da praia da Backdoor, zona sul de Ilhéus-Ba.

Os extratos foram pesados e avaliados a sua solubilidade em meio aquoso e marinho com 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) v/v. A partir disso, foram realizadas diluições em concentrações equidistantes, com no mínimo 5 pontos, a partir da massa de extrato solúvel. De cada concentração preparada foi transferido 10 mL em um tubo de ensaio com 10 indivíduos *A. salina*, com extremidade fechada com algodão e sob a luz de incandescente de 40 W. O branco desse método consistiu na adição de 10 mL de água do mar filtrado com 1 % de DMSO v/v com a adição de 10 indivíduos *A. salina* (FAKENBERG; HORTA; LHULLIER, 2006).

Esse bioensaio foi realizado em 4 replicatas por cada concentração avaliada individualmente avaliado em extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de *Eriope blanchetii*. Com auxílio de uma pipeta de Pasteur, foi realizada a contagem dos indivíduos mortos, após 24 horas sob a luz incandescente de 50W. Considerou-se o como “morto” a observação no tempo de 10 s a ausência de movimento durante a contagem individual sob a luz (DAVID et al., 2001; FAKENBERG; HORTA; LHULLIER, 2006).

Para estimativa de toxicidade considerou-se as concentrações que melhor satisfizes a concordância probabilística de linearidade de taxa de indivíduos mortos *A. salina* de acordo com o somatório de 4 grupos de indivíduos *A. salina* para representatividade probabilística experimental a ser testado através do cálculo qui-quadrado χ^2 (LIMA et al., 2011).

O cálculo de estimativa de concentração letal (CL_{50}) foi obtido como sendo a concentração letal que equivale a taxa de letalidade de 50 % de indivíduos mortos através do uso da equação de regressão linear plotado pelo software Microsoft Excel 2016[®]. O teste estatístico χ^2 das concentrações solúveis testadas foram realizados dentro dos parâmetros de graus de liberdade $GL=3$ e nível de significância $\alpha = 5\%$.

4.5.3. Atividade acetilcolinesterase

A avaliação de inibição acetilcolinesterase (*in vitro*) foi feita utilizando a metodologia de Ellman et al (1961) com algumas adaptações proposta por Lima (2009). O método avaliativo foi realizada mediante ao uso de microplaca com depósito de 40 µL de iodeto de acetiltiocolina 15 mM, 140 µL de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] 3 mM, 65 µL de tampão fosfato, pH=8 com 0,1% de soro de albumina bovina e 40 µL da solução de extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* em 5 concentrações equidistantes de 50 a 500 µg·mL⁻¹. Para comparação de resultados a serem avaliados foi empregado o padrão de fisostigmina nas concentrações equidistantes entre 0,1 a 30 µg·mL⁻¹. A microplaca foi incubada em uma estufa a 37°C por 10 minutos e em seguida submetido à análise de sinal de absorvância (ABS) no espectrofotômetro UV/Vis (Thermo Scientific Multiskan Go) no comprimento de onda 405 nm. Posteriormente foi adicionado 40 µL da solução da enzima AChE (0,22 U·mL⁻¹) e analisado o sinal ABS novamente após 5 minutos. Toda a avaliação foi feita em triplicata (ELLMAN et al., 1961).

Com base nos valores de ABS foi calculado os valores de concentração inibitória (CI₅₀), pelo método de regressão linear das amostras e padrão analisados, e em seguida determinou-se a concentração de inibitória (CI₅₀) conforme a equação 10.

$$CI_{50} = \frac{(AChE - AChI) \times 100}{AChE} \quad (10)$$

Onde, AChI: atividade obtida na presença do inibidor e AChE: ausência do inibidor.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Avaliação *simplex-centroide* nos extratos

Na Tabela 4 é apresentado em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, teor de extrato obtido por amostra utilizada no procedimento de maceração exaustiva de folhas (F), partes aéreas (P) e caule (C) de *E. blanchetii*, conforme o planejamento de misturas *simplex-centroide*. Foi observado que o tratamento 1, correspondente ao solvente puro etanol, maior teor de extrato em relação ao uso dos demais solventes nas amostras de folhas. Para as amostras de partes aéreas e caule, o tratamento 4, mistura binária de etanol (E) e acetato de etila (A), conferiu maior teor. Nesse experimento foi observado maior teor para os extratos de folhas.

Tabela 4. Teor de extratos obtidos pelo planejamento *simplex-centroide* de misturas de 3 componentes.

Tratamento	misturas	Concentração de extrato obtido por amostra utilizada ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)		
		F	P	C
1	E	147,84	18,51	32,14
2	A	70,78	8,43	7,24
3	C	87,68	8,62	8,31
4	E/A	100,18	22,85	34,55
5	E/C	92,51	13,12	23,17
6	A/C	83,49	7,51	6,47
7	E/A/C	94,48	11,92	15,29

Obs.: Tipo de matrizes de amostras (F=folhas; P: partes aéreas; C: caule) e tipo de solventes empregados (E= etanol; A=acetato de etila; C=clorofórmio).

Com o uso de solventes de diferentes polaridades é esperado variação na composição química dos extratos obtidos. Assim, diante do objetivo de avaliar compostos fenólicos, para cada extrato, foi determinado o teor de fenólicos totais usando o reagente *Folin & Ciocalteou*.

5.1.1. Determinação de fenólicos totais

A quantificação de fenólicos totais através do reagente Folin & Ciocalteu baseou-se de forma indireta na quantificação de Mo^{+6} formado na reação do complexante molibdênio com o grupo fenol (Figura 16). A mudança do número de oxidação do molibdênio varia de +6 para +5 ocasionando banda de absorção espectral visível próximos de 773 nm conferindo cor verde

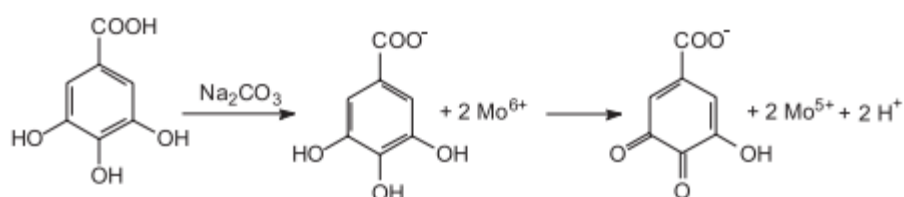


Figura 16. Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin & Ciocalteu (OLIVEIRA et al., 2009).

Para esse método foi obtido a curva analítica $y = 0,017x + 0,0161$ para quantificação de padrão de ácido gálico reagido com Folin & Ciocalteu, com coeficiente correlação linear forte de $r^2 = 0,9983$ entre pontos equidistantes de concentração realizados de 10 a $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Não foi observado desvio de linearidade e efeito de matriz entre correspondente a curva analítica (Figura 17) realizada conforme Ribane et al (2004).

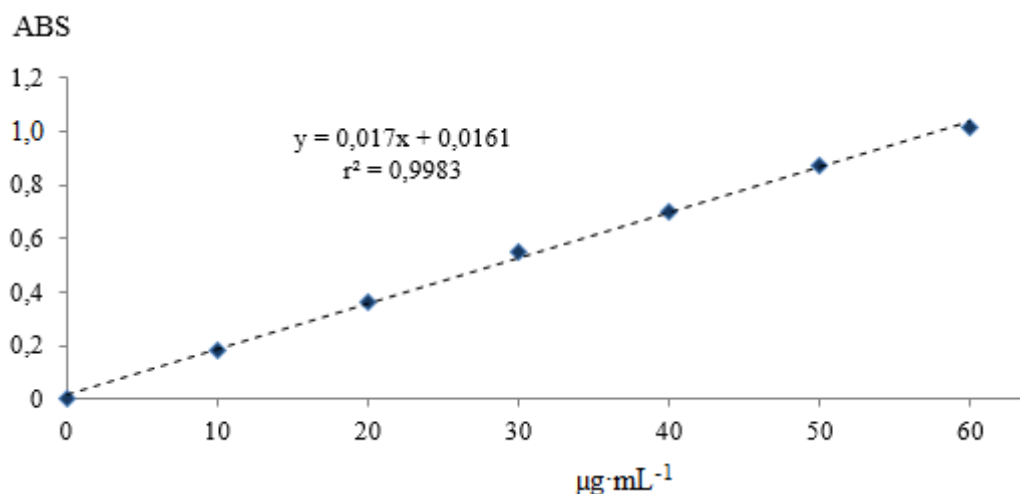


Figura 17. Curva analítica em ácido gálico obtida pelos sinais de absorvância (ABS) entre 10 a $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Quanto a precisão do método espectrofotométrico avaliou-se a variação de 30 sinais de absorvância (ABS) do branco analítico para o cálculo de limite de detecção (LD) e quantificação (LQ). Os valores de ABS correspondente a média do branco e desvio do branco (*s*) foram $\leq 0,0005$ o que indicou boa estabilidade do método do reagente Folin & Ciocalteu sem o analíto (RUIZ; ALARCÓN, 2012). Na Tabela 5, tem-se: LD= 4,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e LQ= 16,7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ o que permitiu-se estabelecer como faixa linear confiável de quantificação de FT entre 16,7 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Tabela 5. Dados obtidos a partir da curva analítica, medidas de 30 sinais de branco analítico e sua equivalência em concentração analítica ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e quantidade analítica (μg).

	ABS	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	μg
Média do branco	0,0005	-----	-----
<i>S</i>	0,0005	-----	-----
S	0,017	-----	-----
LD	0,0971	4,4	88,6
LQ	0,2941	16,7	334,9

Obs.: *s*= desvio padrão do branco; S= ângulo da curva analítica.

Quanto à análise de resíduos (Figura 18) entre as concentrações de ácido gálico utilizadas na elaboração da curva analítica observou-se variações $\leq 5\%$ entre os valores preditos e valores reais que indicaram precisão e confiabilidade analíticas confiáveis para fins de quantificação.

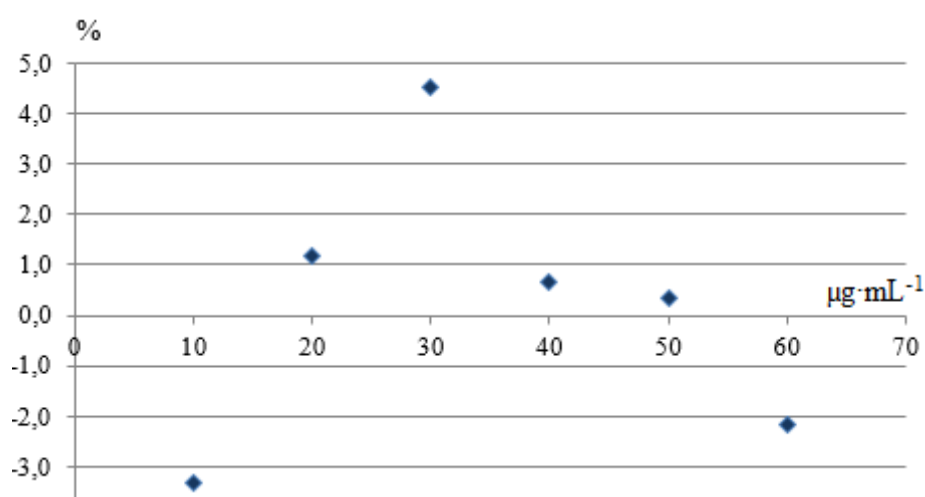


Figura 18. Razão percentual dos valores obtidos e preditos pela curva analítica demonstrando precisão no preparo de concentrações analíticas.

Para fins de avaliar o teor de fenólicos totais em extratos de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* foi convertido a equação da curva analítica (equação 11) considerando a massa de extratos e volume de soluções preparados (equação 12) em razão da quantidade de compostos fenólicos totais calculados (equação 13) por massa de extrato analisado:

$$x = (y - 0,0161) / 0,017 \quad (11)$$

$$Ma = (x \cdot Va) \cdot (Vs / Va) \quad (12)$$

$$FT = Ma / Me \quad (13)$$

Onde: x: Concentração analítica ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

y: Absorvância em 773 nm.

Vs: Volume de solução preparada (mL).

Va: Volume da alíquota (mL)

Ma: Massa equivalente de compostos fenólicos totais (μg)

FT: Teor de comp. fen. totais por massa de amostra ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Me: Massa de extrato (g) preparado na solução Vs

Os extratos foram avaliados em triplicatas para cada tratamento de mistura de solventes sendo determinado os valores brutos do teor de fenólicos totais, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%). Os teores de fenólicos totais de extratos de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* se encontram sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6. Teor de compostos fenólicos totais (FT) expresso em massa de fenóis totais contido em massa seca de amostra de folhas (F), partes aéreas (P) e caule (C).

Tratamento de misturas (triplicatas)	F			P			C		
	FT ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	DP	CV (%)	FT ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	DP	CV (%)	FT ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	DP	CV (%)
1 E	873,9			50074,4			21751,1		
1 E	882,4	19,1	2,2	50012,2	555,4	1,1	20102,3	825,4	3,9
1 E	845,9			49082,8			20998,4		
2 A	317,3			23829,7			16925,6		
2 A	322,1	6,8	2,1	23074,3	417,3	1,8	15959,9	522,7	3,2
2 A	308,7			23144,5			16789,3		
3 C	109,2			25157,9			17525		
3 C	106,2	1,5	1,4	25541,2	747,4	3,0	17181,3	189,5	1,1
3 C	107,3			24098,3			17491,4		
4 E/A	8293,1			60317,6			36131,2		
4 E/A	8481,1	135,0	1,6	61023,2	478,2	0,8	34021,8	1107,7	3,1
4 E/A	8219,2			60111,2			35662,8		
5 E/T	369,8			49236,6			24926,9		
5 E/T	366,2	7,0	1,9	48212,2	618,1	1,3	23914,8	571,3	2,3
5 E/T	356,3			48125,2			24880,1		
6 A/T	232,0			28347,2			29414		
6 A/T	231,1	5,0	2,2	27789,9	281,4	1,0	28998,6	238,8	0,8
6 A/T	222,9			28000,9			29002,2		
7 E/A/T	712,9			45002,9			43659,8		
7 E/A/T	699,2	9,0	1,3	45625,3	772,7	1,7	42589,6	1801,9	4,1
7 E/A/T	716,1			46539,2			46104,9		

Obs.: Solventes utilizados no tratamento de misturas E: etanol; A: acetato de etila; T: triclorometano, D.P.: Desvio Padrão da média, C.V(%): Percentual de Coeficiente de Variação. n=3.

Todos os valores de fenólicos totais calculados (Tabela 6) foram precisos entre as replicatas analisadas com coeficientes de variação percentual (% VC) inferiores a 5%. A partir dos teores de extratos obtidos para cada tratamento de misturas e os teores de fenólicos totais calculados foi elaborado um gráfico comparando esses dados, na Figura 19. Nessa figura as barras representam a concentração ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) de extratos de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* enquanto as linhas sinalizam os teores de fenólicos totais determinados ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

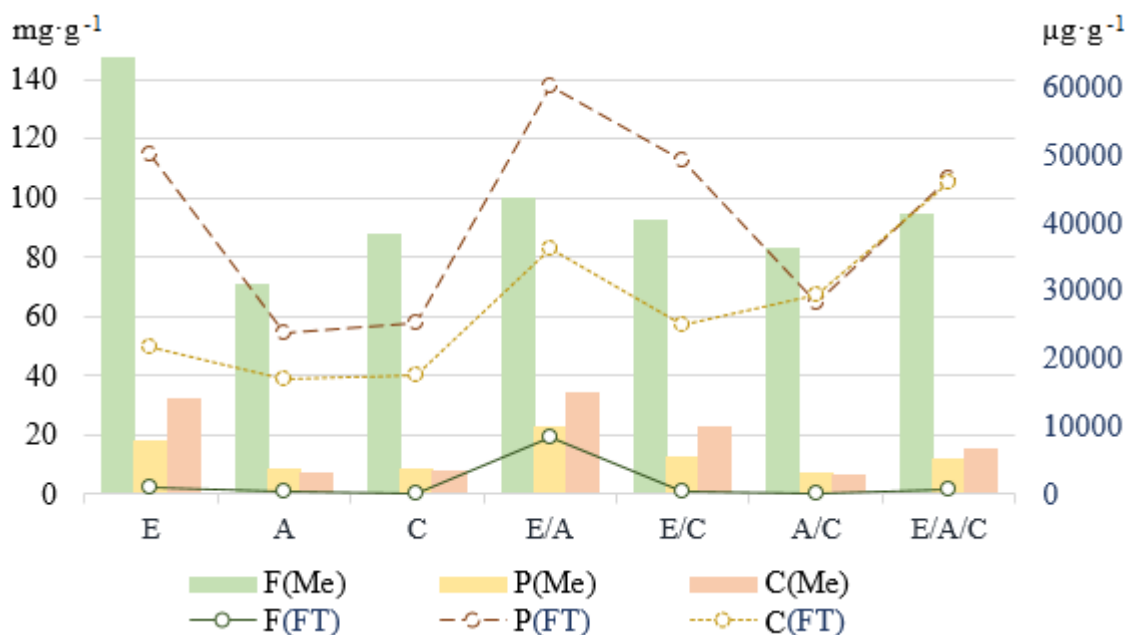


Figura 19. Comparação esquemática de dados obtidos entre teor de extrato (Me) em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, representado em barras e teor de compostos fenólicos totais (FT) em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, representado em linhas, para cada extrato de folhas (F), partes aéreas (P) e caule (C) de *E. blanchetii* obtidos em relação ao planejamento de misturas de solventes etanol (E), acetato de etila (A) e triclorometano=Clorofórmio (C).

Pela Figura 19, observou-se que os maiores teores de extratos correspondem aos extratos de folhas em relação às partes aéreas e caule de *E. blanchetii* independentes do tratamento utilizado de misturas de solventes. Quanto ao teor de compostos fenólicos totais (FT) tem-se para a mistura etanol e acetato de etila na forma binária (E/A) como forte tendência em maximização de FT em que em ordem crescente foram: folhas < caule < partes aéreas.

Notou-se também para a mistura ternária de etanol, acetato de etila e clorofórmio (E/A/C), uma forte tendência em maximização de teores de fenólicos totais nos extratos de partes aéreas e caule de *E. blanchetii*, porém com teores de extratos menores comparado aos extratos obtidos pela mistura de solventes E/A.

Para uma análise mais completa do efeito desses solventes na obtenção de extratos de *E. blanchetii* avaliou-se o planejamento simplex centroide através software Statistica v.7. Para isso avaliou-se qual o modelo matemático de misturas de solventes através da análise de variância (ANOVA) e gráfico de resíduos para escolha do modelo mais significativo e de menor resíduo entre valores preditos e experimentais.

5.1.2. Designação de modelo de misturas

Empregando os valores brutos calculados de teores de fenólicos totais (FT) da Tabela 7 (tópico 5.1.1) avaliou-se os modelos matemáticos simplex centroide nos extratos analisados de folhas, partes aéreas e caule *E. blanchetii* quanto à análise de variância (ANOVA) obtido pelo software statistica v.7 para obtenção de testes de significância entre os modelos lineares, quadrático e cúbico especial.

Os dados sumarizados na Tabela 7 sugerem satisfatoriamente que o modelo cúbico, em todas as amostras de extratos, pois apresentaram coeficientes de determinação R^2 experimental e R^2 ajustados de forte correlação ($R^2 \simeq 0,99$). Para o extrato de partes aéreas de *E. blanchetii* o modelo quadrático também foi satisfatório com $R^2 \simeq 0,99$ (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) dos modelos matemáticos simplex centroide para escolha do modelo matemático significativo que melhor represente o experimento quanto ao fator resposta de determinação de compostos fenólicos totais.

Extratos	Modelos matemáticos	Efeito SS	Resíduo SS	R^2 experimental	R^2 ajustado	F°
Folhas	Linear	$3,28 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	0,20326	0,11473	2,296
	Quadrático	$1,11 \times 10^8$	$1,78 \times 10^7$	0,88946	0,85262	31,04
	Cúbico especial	$1,78 \times 10^7$	$3,76 \times 10^4$	0,99977	0,99967	6643,72
Partes aéreas	Linear	$2,43 \times 10^9$	$1,37 \times 10^9$	0,63957	0,59953	15,9707
	Quadrático	$1,33 \times 10^9$	$3,87 \times 10^7$	0,98982	0,98643	172,094
	Cúbico especial	$3,40 \times 10^7$	$4,65 \times 10^6$	0,99976	0,99825	102,3958
Caule	Linear	$5,48 \times 10^7$	$1,78 \times 10^9$	0,02980	0,00000	2,296
	Quadrático	$1,56 \times 10^9$	$2,21 \times 10^8$	0,87975	0,83967	31,04
	Cúbico especial	$2,09 \times 10^8$	$1,16 \times 10^7$	0,99365	0,99092	6643,72

Obs.: Efeito SS: soma dos quadrados dos valores previstos teoricamente por modelo matemático, Resíduo SS: soma dos quadrados dos valores obtidos experimentalmente, R^2 : coeficiente de determinação e F°: teste de significância entre os valores experimentais e teóricos.

Quanto ao teste de significância (F°) dos modelos matemáticos, o modelo cúbico especial foi o mais satisfatório em extratos de folhas e caule enquanto que em extratos de partes aéreas o modelo cúbico apresentou maior F° indicando também como o mais satisfatório.

Conforme os dados gerados no software Statistica v. 7 pela ANOVA (Tabela 7) não é recomendável o uso dos modelos matemáticos: linear e quadrático para otimização de extração de fenólicos totais em folhas e caule. Para os extratos de partes aéreas analisados somente o modelo matemático linear também não foi recomendável. Para corroborar a ANOVA dos valores brutos de FT entre os modelos matemáticos sugeridos gerou-se os gráfico de resíduos para análise de correlação entre os valores preditos e observados experimentalmente de todos os modelos com coeficiente de determinação R^2 ajustados (Figura 20).

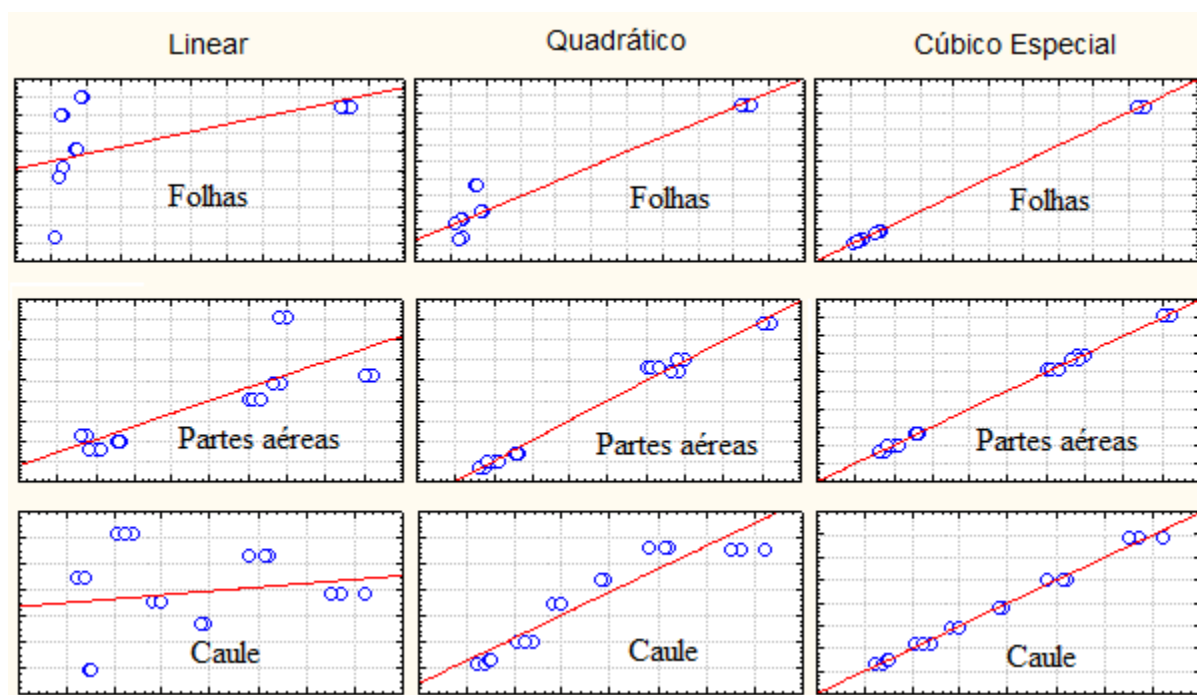


Figura 20. Gráfico de resíduos plotados de acordo com os modelos matemáticos linear, quadrático e cúbico especial. A linha vermelha corresponde ao R^2 ajustado e os círculos em azul como resíduo obtido na relação de valores preditos (eixo vertical) com os valores observados (eixo horizontal) calculados pelo Statistica v. 7.

Esses dados possibilitaram designar como modelo matemático cúbico especial para o estudo de área de contorno e superfície de resposta de teores de fenólicos totais a serem avaliados nos extratos de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* por terem apresentados coeficientes de determinação R^2 experimental e ajustado elevados ($>0,99$), teste de significância F° aceitável e com baixos resíduos obtidos.

5.1.3. Delimitação *simplex-centroide*

Para a avaliação do fator resposta do delimitamento experimental *simplex* centroide de misturas de solventes foram adotados os valores obtidos de teores de compostos fenólicos totais (FT) (anteriormente apresentados na tabela 6) determinados em cada tratamento de misturas de solventes realizado. Para o estudo de delimitamento utilizou-se o modelo matemático cúbico especial estabelecido anteriormente como mais satisfatório (Tabela 7 e Figura 20).

O delimitamento *simplex* centroide de fator resposta foi gerado sob a área e superfície de triângulo equilátero pelo software Statistica v. 7 para representar os efeitos dos solventes na mistura. Para tratamento de misturas de solventes realizados para obtenção de extratos de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* apresentou-se simultaneamente a superfície e área de fator resposta objetivando a maximização de teor de fenólicos totais.

Para o uso de misturas de solventes no preparo de extratos de folhas de *E. blanchetii*, Figura 21, é observado a maximização de FT para o tratamento de mistura binária etanol e acetato de etila representado pela altura de superfície e coloração avermelhada indicando teores próximos de $8000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Nesse caso, sugerimos, o efeito contribuinte do sinergismo entre esses solventes para extrair os compostos fenólicos.

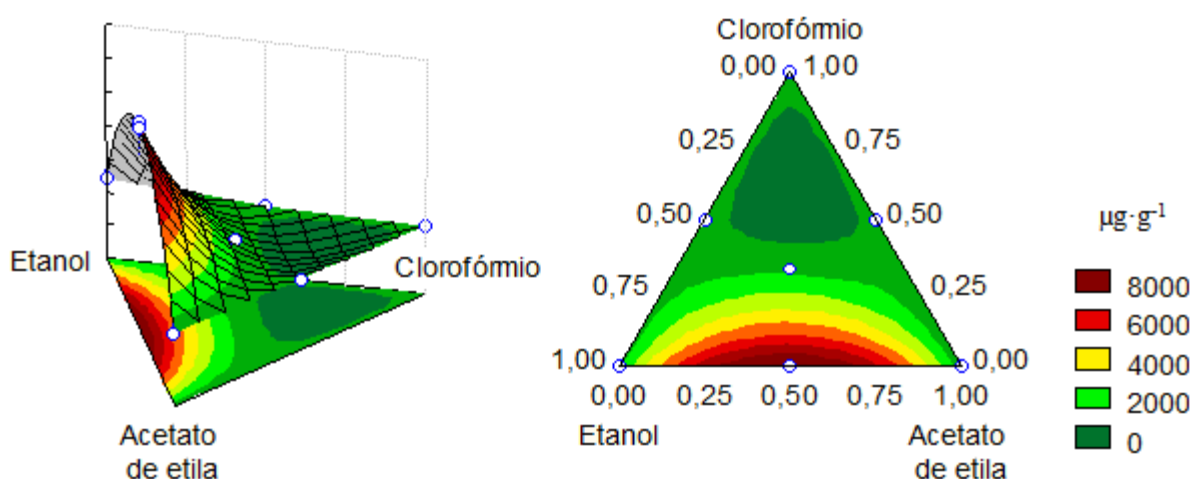


Figura 21. Superfície de resposta ao delimitamento experimental do modelo matemático *simplex*-centroide cúbico especial para avaliação do fator resposta em extratos obtidos de folhas de *E. blanchetii*.

Em amostras de partes aéreas (Figura 22) observou-se que a mistura etanol e acetato de etila resultou em maximização de fenólicos totais representado pela avaliação da altura de superfície de resposta e região de contorno. O tratamento de etanol puro e a mistura binária de etanol e acetato de etila variaram em teores de fenólicos totais entre 50000 e 60000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

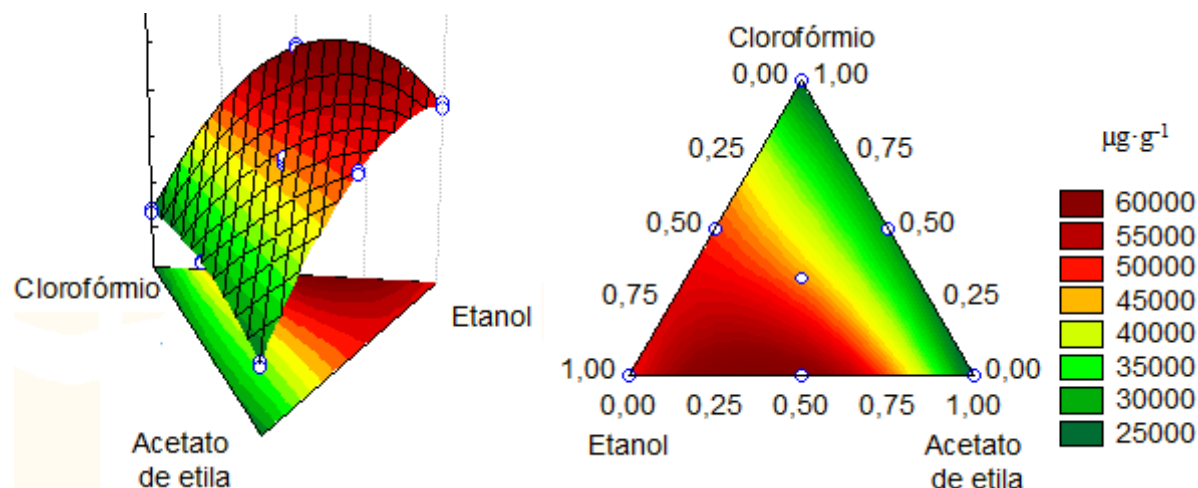


Figura 22. Superfície de resposta ao delimitamento experimental do modelo matemático simplex centroide cúbico especial para avaliação do fator resposta em extratos obtidos de partes aéreas de *E. blanchetii*.

Na Figura 23 está representado o efeito de sinergismo de misturas de solventes sinalizando como região de superfície de resposta maximizada as variações de misturas de etanol e acetato de etila 1:1 e a mistura ternária etanol, acetato de etila e clorofórmio (1:1:1). Os teores de fenólicos totais nessas misturas variaram em torno de 35000 e 40000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

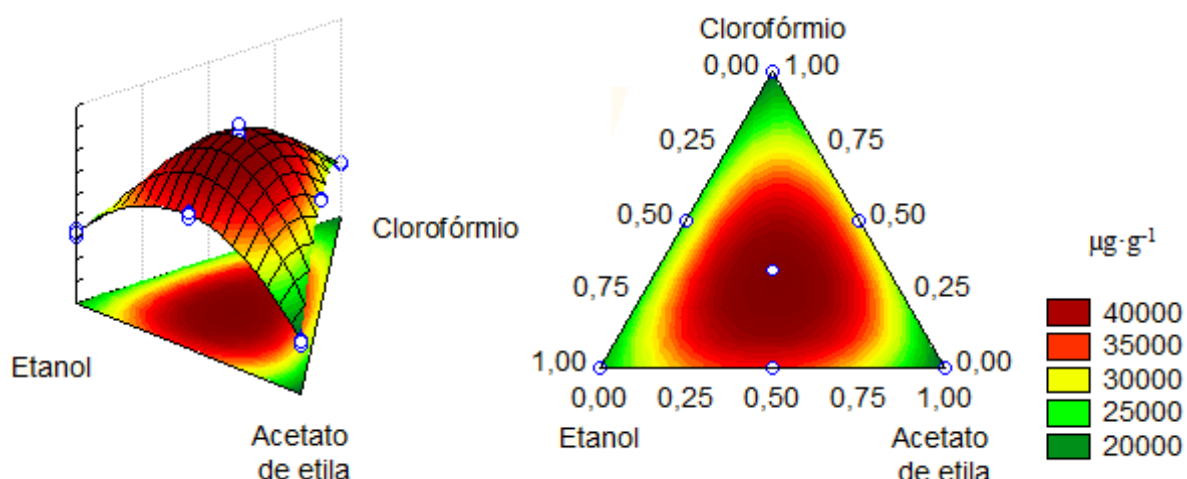


Figura 23. Superfície de resposta ao delimitamento experimental do modelo matemático simplex centroide cúbico especial para avaliação do fator resposta em extratos obtidos de partes aéreas de *E. blanchetii*.

Pela Figura 24, avaliou-se graficamente o efeito do solvente clorofórmio na composição de misturas (pseudo-misturas) de solventes na extração de fenólicos totais de valores preditos matematicamente dos solventes: etanol (E), acetato de etila (A) e clorofórmio (C). Notou-se estatisticamente que o solvente clorofórmio (C) corrobora como efeito antagônico em amostras de folhas e de efeito de sinergismo em partes aéreas e caule de *E. blanchetii*.

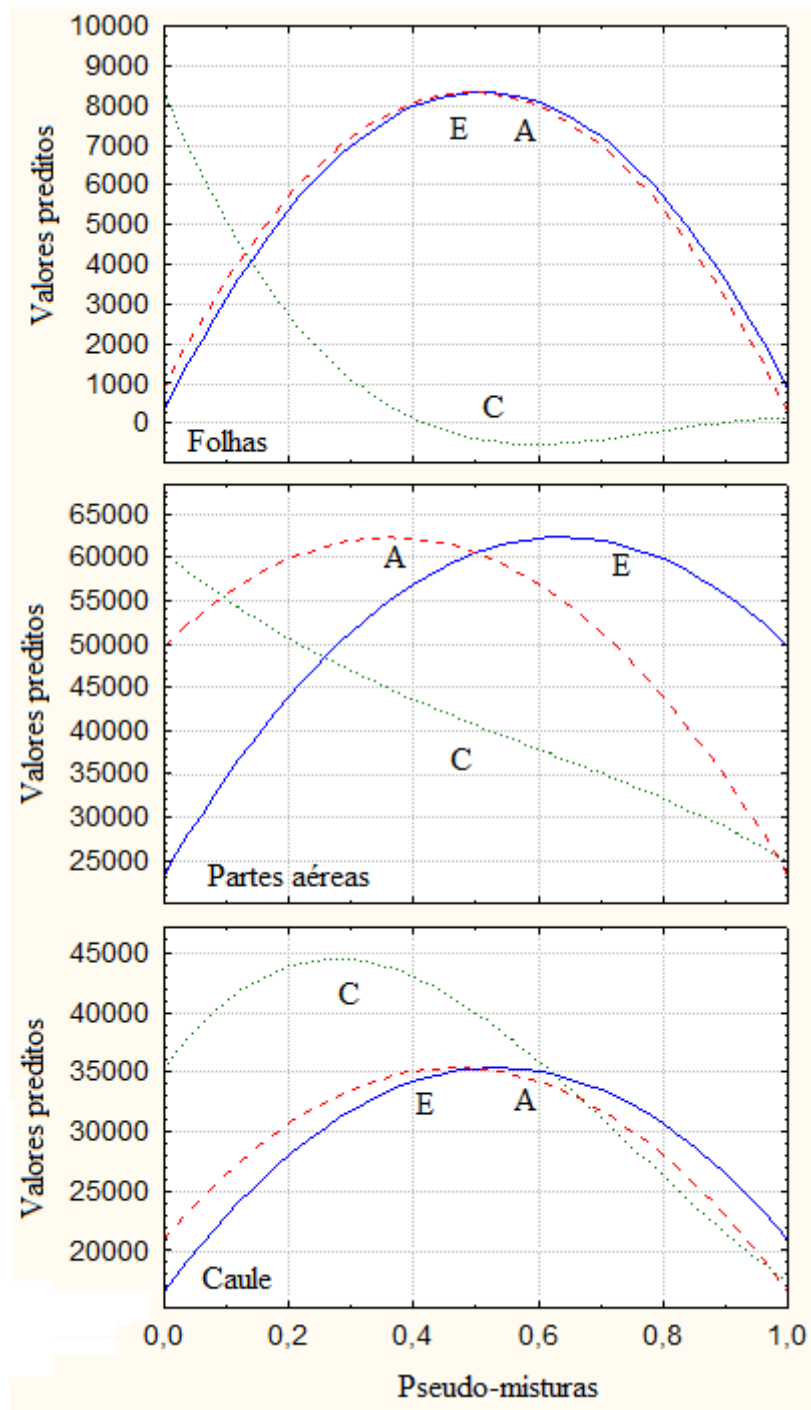


Figura 24. Efeito forte de sinergismo confirmado matematicamente do solvente clorofórmio (solvente C) e em relação aos outros solventes etanol (E) e acetato de etila (A) com pseudo-misturas apenas em amostras de caule de *E. blanchetii*.

5.2. Determinação de ácidos fenólicos

A classe de compostos fenólicos é bastante ampla, então dentro do objetivo de avaliar especificamente o ácido rosmarínico, que são encontrados na forma de ésteres empregamos a metodologia de Moores e colaboradores (1948), para quantificação de ésteres de ácidos fenólicos por espectrofotometria, e pelo método de Medrado et al (2017) que para separação e identificação através de Ultra Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Ultra-CLAE), em fase reversa acoplado ao Detector de Arranjo de Diodos (DAD).

5.2.1. Determinação de ésteres de ácidos fenólicos

A adição de acetato de chumbo II em ácido rosmarínico promove em meio aquoso a formação de sal de chumbo II de éster fenólico, que nesse caso origina o sal clorogenato de chumbo II (Figura 25). O ácido rosmarínico, assim como a maioria dos demais ésteres de ácidos fenólicos, possuem banda de absorção molecular característico em 324 nm e a adição de acetato de chumbo II diminui a absorvância quando analisadas no espectrofotômetro (MOORES; DOROTHY; WOOD, 1948).

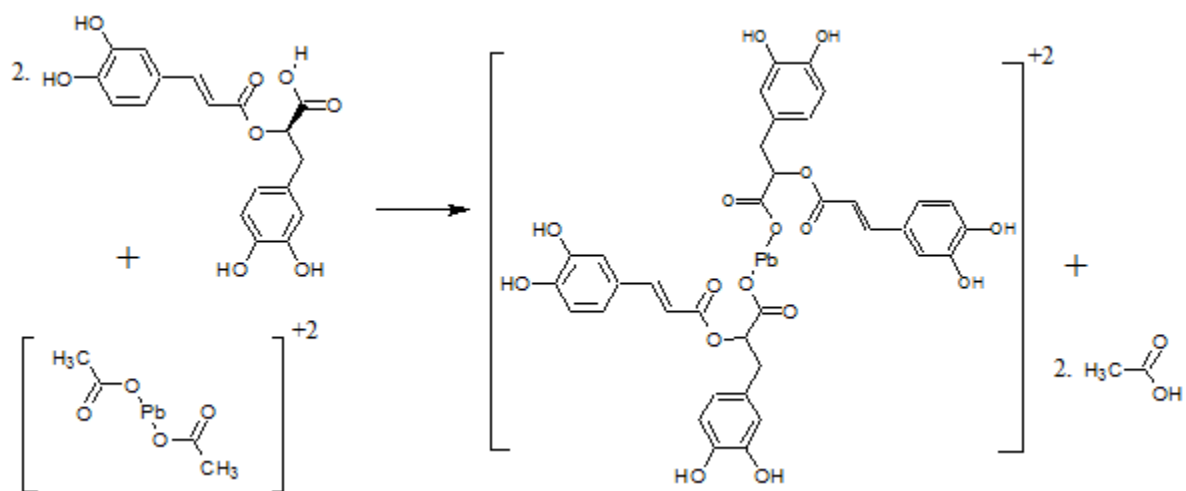


Figura 25. Reação de ácido rosmarínico com acetato de chumbo II em meio aquoso para formação de clorogenato de chumbo II

A perda do sinal de absorvância (ABS) varia com a quantidade de acetato de chumbo adicionado conforme a figura 26. Observou-se que o espectro ultravioleta do ácido rosmarínico quando reagido com acetato de chumbo resultou em efeito hipsocrômico, ou seja diminuição da altura na banda de absorvância de 324 nm (MOORES; DOROTHY; WOOD, 1948).

Para avaliação qualitativa dos extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii*, preparou uma solução aquosa de cada amostra em $170 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sem a adição de acetato de chumbo (Figura 26). O espectro de extrato de folhas demonstrou banda e altura superiores em relação aos espectros de extratos partes aéreas e caule avaliados em 324 nm o que indicou grandes chances de presença de ésteres de ácidos fenólicos.

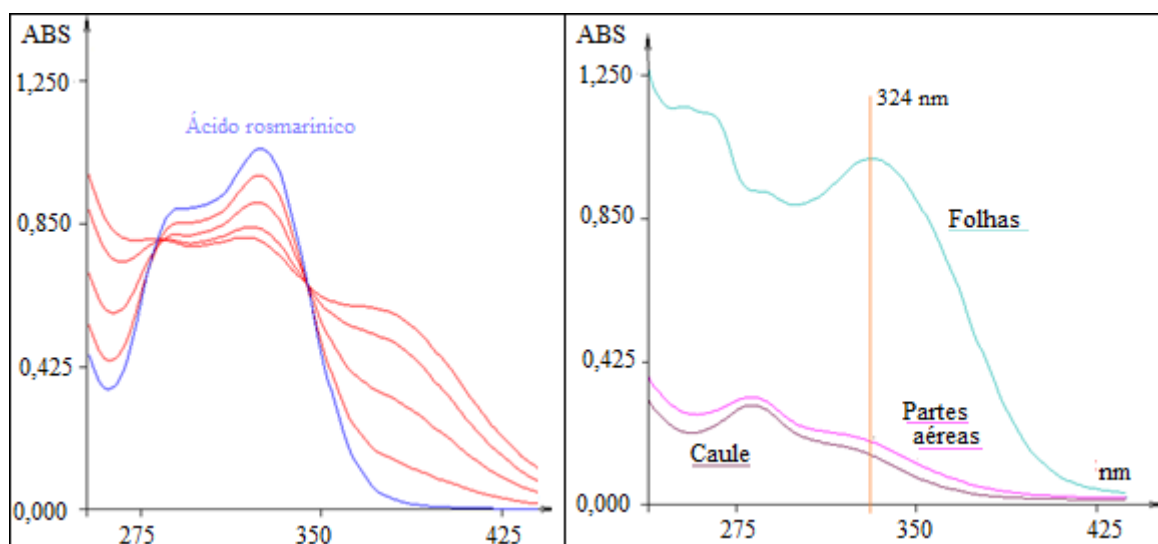


Figura 26. Espectro ao lado esquerdo correspondente ao efeito hipsocrômico com banda de absorvância em 324 nm do padrão de ácido rosmarínico (espectro em azul) frente a adição de acetato de chumbo II. Espectros ao lado direito correspondente aos extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* em $170 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Sendo assim avaliou-se a seletividade dos extratos otimizados frente a adição de acetato de chumbo II quanto aos efeitos hipsocrômicos (Figura 27). Na análise de extratos otimizados de folhas, esse efeito foi mais pronunciado do que nos demais extratos otimizados de *E. blanchetii*.

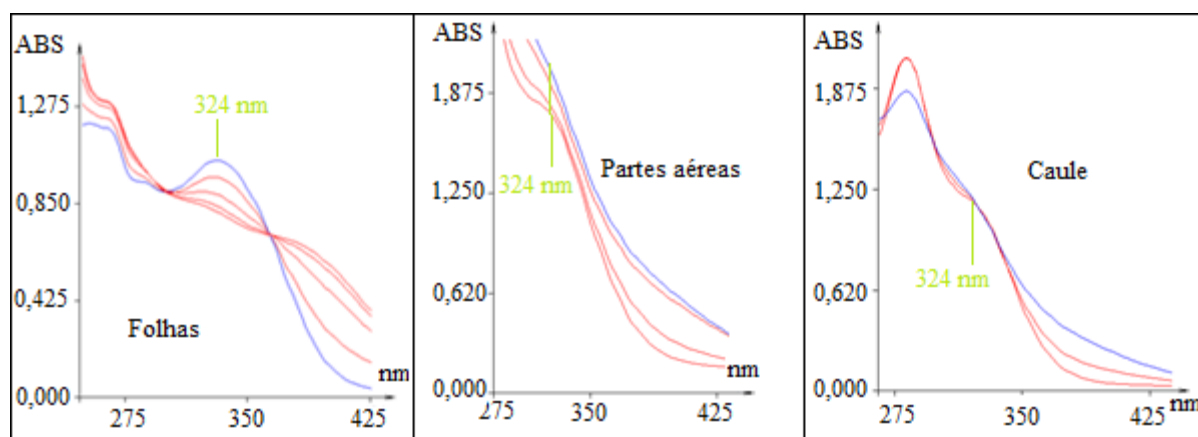


Figura 27. Efeito hipsocrômico em 324 nm do extratos de *E. blanchetii* nas soluções analisadas de $170 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (folhas), $650 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (partes aéreas) e $720 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (caule).

Pelo aspecto visual dos espectros analisados de extratos otimizados de $170 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (folhas), $650 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (partes aéreas) e $720 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (caule) pode-se inferir que não exista quantidades significativas pelo teste de seletividade de ésteres de ácidos fenólicos (ácidos clorogênicos) em partes aéreas e caule.

Para quantificação de ésteres de ácidos fenólicos realizou-se uma curva analítica com adição e sem adição de padrão de acetato de chumbo II (Figura 28). Observou-se que a adição de acetato de chumbo II não influenciou muito na linearidade entre 4 e $7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ demonstrando assim forte correlação com $r^2 \simeq 0,999$.

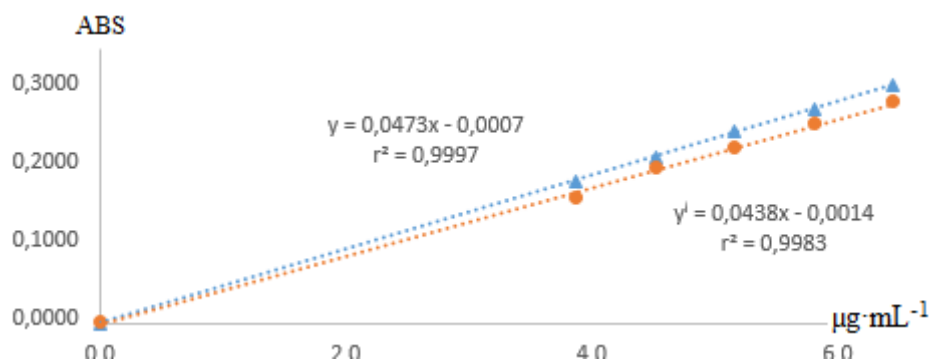


Figura 28. Curva analítica de padrão de ácido rosmarínico (em azul) com adição e sem adição de acetato de chumbo II (laranja)

Dessa forma, utilizou-se a curva analítica de ácido rosmarínico ($y' = 0,0438 x - 0,0014$) com adição de acetato de chumbo II onde cada concentração foi preparada com 60 μ L de solução saturada de acetato de chumbo II em 10 mL de solução aquosa de padrão de ácido rosmarínico. Realizou também, a medida de 30 sinais de brancos (60 μ L de solução saturada de acetato de chumbo II em 10 mL de água destilada) para o cálculo de limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) conforme Ribane et al (2004), tendo como desvio padrão o valor de 0,0008 com LD =1,27 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e LQ =3,85 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

O teor de ésteres de ácidos fenólicos (TEAF) foi calculado conforme a equação 12 em que ABS corresponde a absorvância medida da alíquota preparada correspondente ao volume analisado (Va) com a massa de extrato correspondente ao volume da alíquota preparada (Mea). O teor de ésteres de ácidos fenólicos dos extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* estão sumarizados na tabela 8.

$$\text{TEAF} = [(\text{ABS} + 0,0014)/0,0438] \times (\text{Va}/\text{Mea}) \quad (12)$$

Tabela 8. Análise quantitativa de ésteres de ácidos fenólicos em extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii*

Extratos otimizados	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ *	Média $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	DP	%CV
Folhas	1854,2	1854,2	90,0	4,9
	1707,7			
	1871,5			
Partes aéreas	358,6	358,6	12,7	3,5
	338,2			
	361,6			
Caule	349,6	341,8	6,2	1,8
	341,8			
	337,2			

Obs.: DP: desvio padrão, %CV: percentual de coeficiente de variação. * microgramas equivalentes de padrão de ácido rosmarínico.

A partir da determinação de teor de ésteres de ácidos fenólicos mais elevado correspondente a 1854,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ do extrato otimizado de folhas de *E. blanchetii*, foi realizado o teste de fortificação, adotando a metodologia de Ribane et al (2004). Nesse caso, foram utilizados 3 níveis de concentração de adição de padrão de ácido rosmarínico (entre 4 e 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a partir de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ésteres quantificados em solução dos extratos otimizado de folhas de *E. blanchetii*.

Na Tabela 9 encontram-se os resultados categorizados para as análises de 3 replicatas (n=3), de cada nível de concentração preparada, concentração determinada experimentalmente e fator de recuperação calculados; com média e coeficiente de variação (%CV).

Tabela 9. Resultado do teste de fortificação de solução de extrato otimizado de folhas com variação de 3 níveis de concentração padrão de ácido rosmarínico

Concentração final somada à amostra ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Concentração analisada ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Fator recuperação (%)	Média	% CV
4,0	4,04	99,0	99,0	3,5
4,0	4,18	95,5		
4,0	3,91	102,5		
4,5	4,62	97,8	100,9	3,6
4,5	4,50	100,0		
4,5	4,28	104,9		
5,0	4,90	102,0	98,1	3,4
5,0	5,21	96,0		
5,0	5,18	96,4		

%CV: coeficiente de variação, n=3

5.2.1. Identificação e quantificação de ácido rosmarínico

O método de Medrado et al (2017) foi desenvolvido para determinação de derivados de ácidos hidroxicinâmicos através de uso de padrões cromatográficos. Objetivando quantificar o ácido rosmarínico foi adaptado esse método para análise de um dos extratos otimizados de *E. blanchetii*. Nesse método foi escolhido o extrato otimizado de folhas de *E. blanchetii* por apresentar maior teor de ésteres de ácidos fenólicos.

O método de Medrado et al (2017) foi adaptado para análise de fluxo $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em que a coluna Shimadzu[®] VP-ODS-C-18 (150mm x 2mm x $5\mu\text{m}$) permitiu separar no tempo de retenção de 9,649 min com detector ajustado para 254 nm (Figura 29). Nesse tempo de retenção foi feita uma varredura entre 2000 e 400 nm para fins de identificação com bandas de espectrais de 326 e 235 nm.

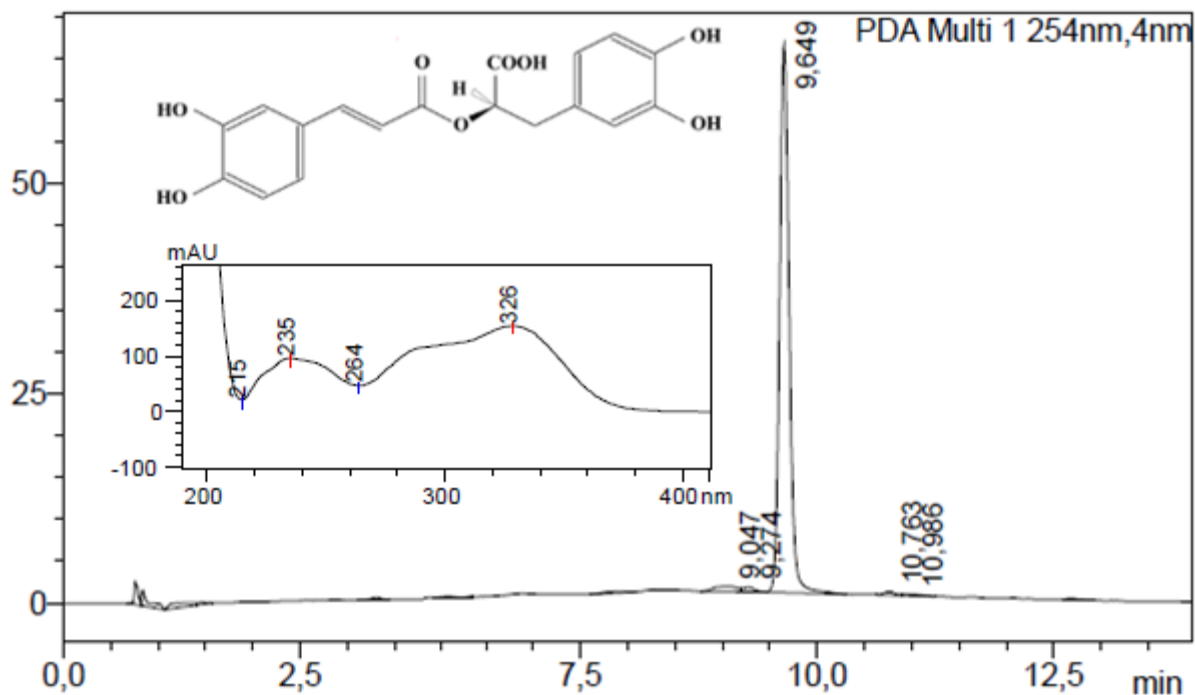


Figura 29. Perfil cromatográfico do padrão de ácido rosmarínico em 254 nm sob o fluxo de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e varredura espectral obtido pelo detector DAD do padrão de ácido rosmarínico.

Foi observado boa simetria e resolução do padrão de ácido rosmarínico pela Figura 29 e boa sensibilidade do detector DAD acoplado ao cromatógrafo líquido de ultra eficiência. Dessa forma foi elaborado uma curva analítica de ácido rosmarínico equivalente em unidades de áreas (mAu) entre as quantidades injetadas aleatoriamente de 38,5 a 275 ng. Essas injeções foram aplicadas em triplicatas e a curva analítica foi obtida pela média dessas quantidades trabalhadas (Tabela 10 e Figura 30).

Tabela 10. Variações aleatória de volumes de injeções utilizadas para a obtenção de curva analítica de ácido rosmarínico e quantidades detectadas entre 38,5 à 275 pg equivalente em unidades de área (mAu) do detector DAD sob fluxo de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, tempo de retenção de 9,6 min e em 329 nm.

Volume injetado (μL)	μg	ng	área 1 (mAu)	área 2 (mAu)	área 3 (mAu)	área média (mAu)
0	0	0,0	0	2	10	4
0,7	0,0385	38,5	75683	75693	75844,39	75693
1	0,055	55	104176	103599	103806,2	103806,2
4	0,22	220	424901	424922	425771,8	424922
3	0,165	165	320732	325543	326194,1	325543
2	0,11	110	215895	213488	213915	213915
0,8	0,044	44	84180	85627	85798,25	85627
5	0,275	275	520880	517995	519031	519031

A curva analítica de ácido rosmarínico foi obtido com coeficiente de determinação de $r^2=0,9993$ o que é uma fortíssima correlação linear entre as injeções quantitativas trabalhadas. Foi sugerido como limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) o sinal de ruído obtido pela ausência de injeção de padrão, equivalente em unidades de áreas em 12 e 40 mAu.

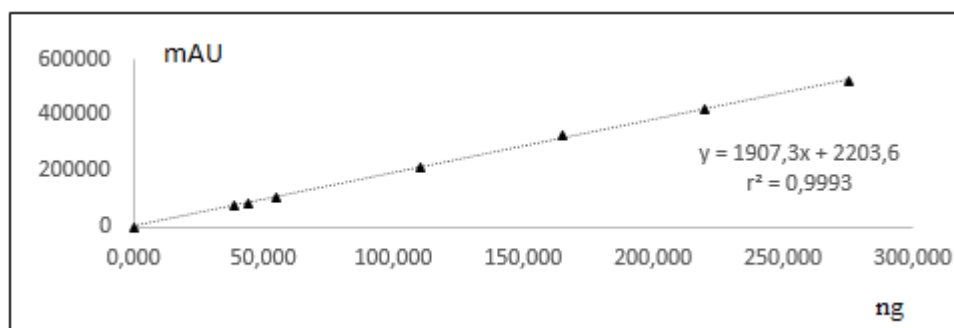


Figura 30. Curva analítica de ácido rosmarínico com DAD ajustado para 254 nm.

Na análise cromatográfica de extrato otimizado de folhas de *E. blanchetii* obteve-se o mesmo tempo de retenção ($Tr=9,6$ min) e mesmo perfil de varredura espectral do padrão de ácido rosmarínico. Pelo perfil cromatográfico observou-se boa separação e resolução cromatográfica entre os picos cromatográficos vizinhos (Figura 31).

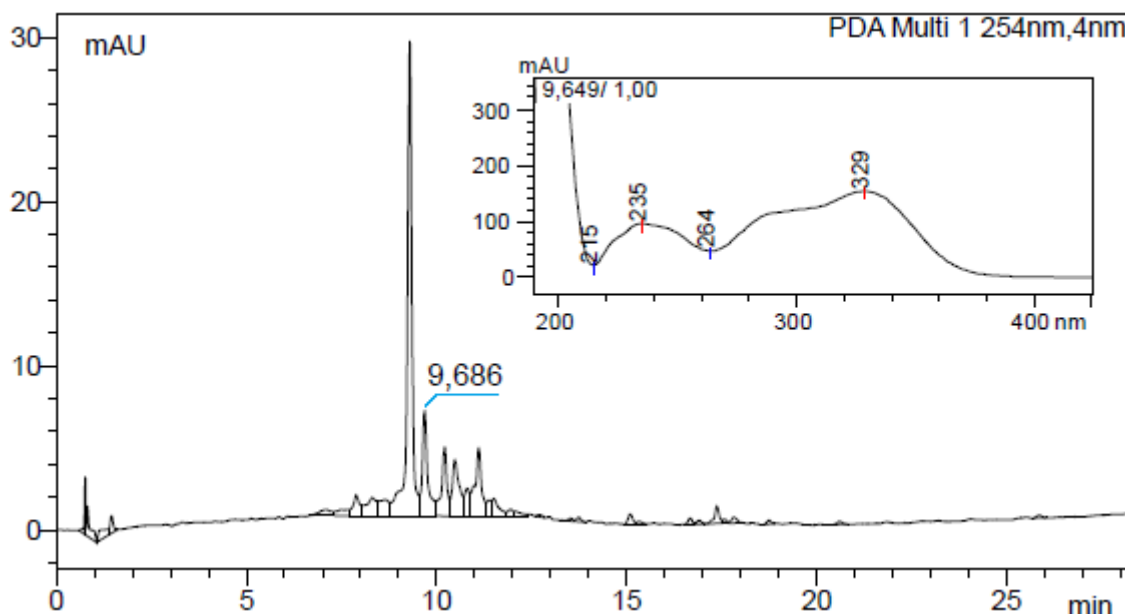


Figura 31. Perfil cromatográfico e da varredura espectral DAD de injeção de 5 μL de extrato otimizado de folhas de *E. blanchetii* sob o fluxo de $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Na análise quantitativa foram preparadas 3 (três) replicatas de soluções de extratos otimizados de folhas de *E. blanchetii* (cerca de $2,0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), foram injetados 5 μL (equivalente a 10 μg de extrato solubilizado em 0,1% de ácido acético). A quantificação foi feita com base na curva analítica de ácido rosmarínico (Tabela 11). Observou-se boa precisão entre as áreas obtidas ($CV \leq 5\%$) e média equivalente à ácido rosmarínico separado e quantificado por cromatografia de ultra eficiência de 35,24 ng.

Tabela 11. Quantificação de ácido rosmarínico em extrato otimizado de folhas de *E. blanchetii* através da curva analítica $y = 1908,3 x + 2203,6$ e injeção de 5 μL de amostra, em 254 nm, $Tr = 9,6$ min e fluxo de análise cromatográfica de $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ em CLAE-DAD.

	área 1 (mAU)	área 2 (mAU)	área 3 (mAU)	Média (mAU)	ácido rosmarínico (ng)	CV %
Extrato otimizado de folhas	63978	68874	70258	67702,3	35,24	4,87

CV %: Coeficiente de variação percentual; Tr: Tempo de retenção

A partir de resultados obtidos de teores de fenólicos totais, de ésteres de ácidos fenólicos e de teor de ácido rosmarínico em extratos otimizados de folhas de *E. blanchetii* foi elaborado um gráfico correlacionando esses dados na Figura 32. Dessa forma pode-se inferir que a quantidade de ácido rosmarínico presente nos extratos de folhas foram inferiores a 1% em relação à composição de todo teor de fenólicos totais presente na forma de extrato.

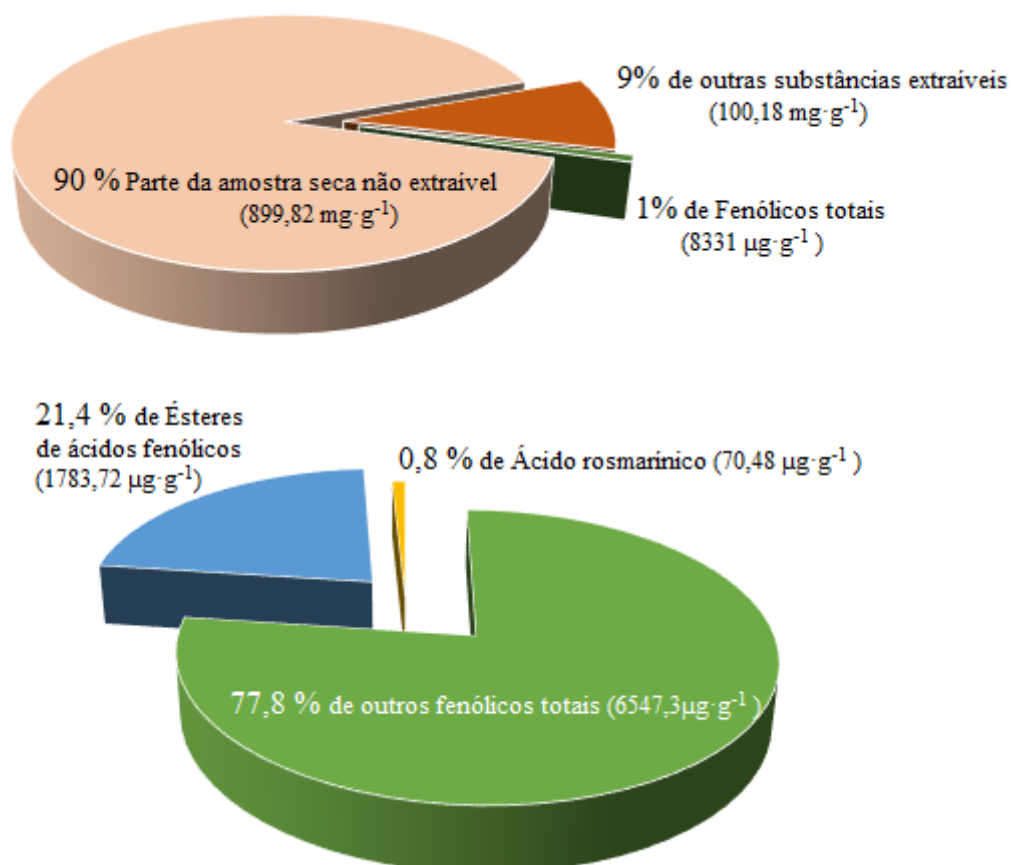


Figura 32. Gráfico de pizzas para composição percentual de substâncias extraíveis no método otimizado em amostras secas de folhas com solvente etanol e acetato de etila 1:1 e composição percentual de em relação ao conteúdo total de fenólicos totais avaliados.

5.3. Avaliação biológica nos extratos otimizados

As análises desenvolvidas nesse trabalho demonstra a presença de derivados de compostos fenólicos nos extratos obtidos pelo método de extração otimizada para diferentes partes da espécie *E. blanchetii* e a estes compostos são atribuída diversas atividades biológicas, por exemplo, o ácido rosmarínico que é um forte antioxidante (DAVID et al., 2012; SCHERER; GODOY, 2009). Mediante a isso, nos extratos otimizados de *E. blanchetii*, foram avaliados a atividade antioxidante, letalidade frente a *A. salina* e teste de inibição da enzima acetilcolinesterase.

5.3.1. Atividade antioxidante

Os extratos otimizados foram submetidos à avaliação de atividade antioxidante com base na reação de sequestro de radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) com leitura a 517 nm. Conforme a Figura 33, a atividade antioxidante foi determinado pela variação de concentração de espécies radical estável DPPH (SCHERER; GODOY, 2009).

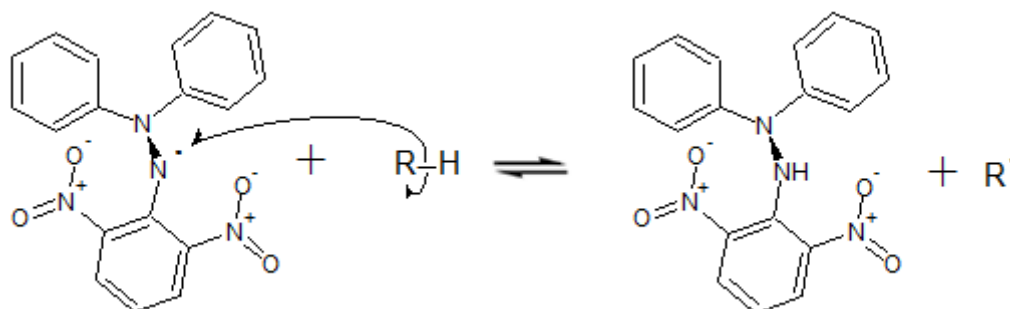


Figura 33. Reação e equilíbrio químico esquemático de uma substancia antioxidante qualquer doadora de hidrogênio (R-H) com radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).

Para o estabelecimento de tempo de reação no estudo da cinética empregou primeiramente a análise da reação do extrato otimizado de folhas com DPPH que apresentou o maior teor de ésteres de fenólicos totais e maior quantidade de extrato para a execução desse experimento.

Conforme a Tabela 12, observou-se que entre as concentrações de 68 à 272 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ avaliados nos extratos otimizados de folhas ocorreu equilíbrio químico em 517 nm entre 25 e 30 min. Sendo assim, estabeleceu-se como tempo de reação para todos os extratos otimizados o intervalo de 25 min de reação de sequestro de radicais livres.

Tabela 12. Tempo de reação do extrato otimizado de folhas de *E*.

Tempo Min	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
	0	68	136	204	272
0	1,1723	1,1657	1,1354	1,1058	1,0725
5	1,1723	1,1556	1,1091	1,0839	1,044
10	1,1723	1,1524	1,1012	1,0713	1,0283
15	1,1723	1,149	1,0966	1,0647	1,0188
20	1,1723	1,1478	1,0919	1,0595	1,0135
25	1,1722	1,1456	1,0918	1,0563	1,0128
30	1,1722	1,1451	1,0906	1,0533	1,012

Para comparar a atividade antioxidante dos extratos realizou-se a avaliação em triplicata do padrão de 2,6 di-terc-butil metil fenol (BHT) em diferentes concentrações, no tempo de reação de 25 minutos (Tabela 13). A média percentual de sequestro de radicais livres (%SRL) foram precisos com coeficiente de variação percentual (%CV) inferiores a 5%.

Tabela 13. Padrão de BHT variando concentração e média percentual de sequestro de radicais livre (% SRL) e seus respectivos coeficientes de variação (% CV) para obtenção da equação de regressão linear

$\mu\text{g.mL}^{-1}$	11,3	44	77	111	143	176
% SRL	3,18	20,33	39,29	54,66	64,88	79,18
% CV	0,96	3,82	4,58	2,86	4,83	0,13

Obs.: valores obtidos e calculados em triplicata com 95% de confiança

Na Tabela 14 encontra-se sumarizados os valores obtidos de %SRL dos extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* em triplicata (n=3). Foram observados boa precisão dentro do intervalo de reação de 25 min com CV < 5%.

Tabela 14. Análise de extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii* expressos em média percentual (%SRL) e coeficiente de variação percentual (%CV) para obtenção da equação de regressão linear.

concentrações $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Folhas		Partes aéreas		Caule	
	Média (%SRL)	%CV	Média (%SRL)	%CV	Média (%SRL)	%CV
1000	73,20	0,03	27,26	1,54	23,09	1,04
800	55,31	0,05	22,08	0,54	19,44	0,62
600	45,27	0,20	17,93	1,23	15,09	0,66
400	30,62	0,12	13,72	0,36	11,41	2,28
200	17,08	0,12	8,71	0,34	7,36	1,09
20	7,49	2,40	4,73	1,69	3,62	3,59

Obs.: valores obtidos e calculados em triplicata com 95% de confiança.

A partir dos valores sumarizados das tabelas 13 e 14 e conforme a metodologia de Scherer e Godoy (2009) foi plotado um gráfico de %SRL versus concentração para obtenção da regressão linear do padrão BHT e dos extratos otimizados para determinação de %SRL, CE_{50} e IAA (Figura 34).

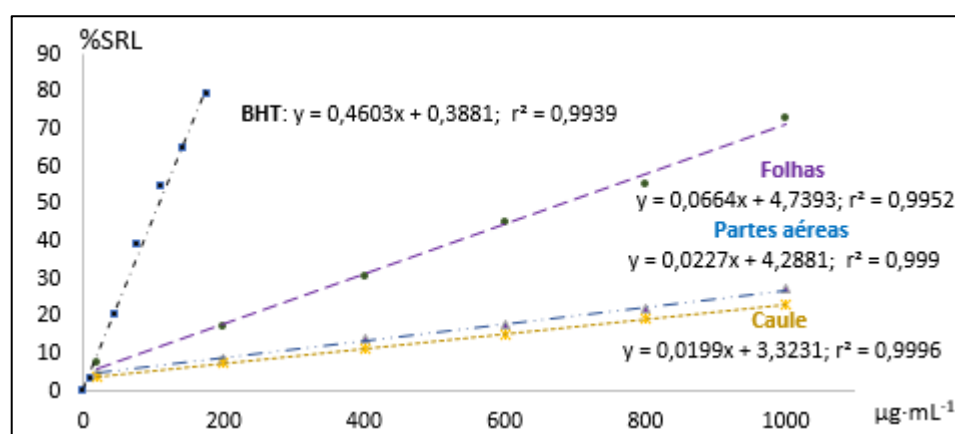


Figura 34. Plotagem dos valores obtidos da média percentual de sequestro de radicais livres (%SRL) em relação as diferentes concentrações equidistantes do padrão BHT e dos extratos otimizados *Eriope blanchetii*.

De acordo com a Figura 33, foram obtidos as regressões: padrão BHT: $y = 0,4603x + 0,3881$; $r^2 = 0,9939$, extrato de folhas: $y = 0,0664x + 4,7393$; $r^2 = 0,9952$, extrato de partes aéreas: $y = 0,0227x + 4,2881$; $r^2 = 0,9990$ e extrato de caule: $y = 0,0199x + 3,3231$; $r^2 = 0,9996$. Pela análise visual do gráfico observou-se que o extrato de folhas foi o mais antioxidante em relação à avaliação da inclinação da reta e o coeficiente angular das equações de regressão linear

A média dos valores calculados de CE_{50} e IAA correspondentes ao padrão BHT e aos extratos otimizados se encontram sumarizados na Tabela 15. Para melhor comparação dos resultados realizou-se o teste turkey com significância $\alpha = 5\%$ e constatou-se que não houve diferença significativa na avaliação dos extratos otimizados de partes aéreas e caule.

Tabela 15. Resultado expresso em CE_{50} e IAA da análise de extratos (folhas, partes aéreas e caule) pela mistura de solventes etanol e acetato de etila 1:1 comparado com o padrão BHT

Amostras avaliadas	CE_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IAA
Folhas*	646,71 ^a	2,22 ^a
Partes aéreas*	2281,50 ^b	0,52 ^b
Caule*	2330,01 ^b	0,51 ^b
BHT	105,79 ^c	11,20 ^c

Obs.: *: extratos otimizados de *E. blanchetii*, os termos ^{a, b, c, a', b', c'} indicaram diferenças significativas entre as médias avaliadas pelo teste turkey com significância $\alpha=5\%$.

Nesse experimento foi utilizado como parâmetro comparativo os valores de IAA em que possibilitam estimar a força de atividade antioxidante que varia de pobre ($IAA < 0,5$), moderado ($0,5 < IAA < 1$), forte (IAA entre 1,0 e 2,0) e extremamente forte com $IAA > 2,0$ (SCHERER; GODOY, 2009). Nesse sentido, o extrato otimizado de folhas é classificado como forte antioxidante ($IAA > 2,0$) enquanto que os extratos otimizados de partes aéreas e caule são classificados como antioxidantes moderados com $1 > IAA > 0,5$.

Não há relatos de determinação de atividade antioxidante em extratos de *E. blanchetii* obtidos através de maceração com solvente etanol e acetato de etila 1:1 pela estratégia de otimizar experimentos. Em um estudo anterior relacionado ao isolamento de ácido rosmarínico em *E. blanchetii* foi relatado como potencial antioxidante comparado ao BHT. Nesse trabalho constatou-se que a concentração de teor de ésteres de ácidos fenólicos

influência na composição de extrato na determinação de capacidade antioxidante em que no extrato otimizado de folhas de *E. blanchetii* foi avaliado como forte antioxidante.

5.3.2. Letalidade frente a *Artemia salina*

O estudo de letalidade frente a *A. salina* é um método prático e de baixo custo de triagem para futuras avaliações frente a testes biológicos. Uma das dificuldades desse teste é a solubilidade de extrato em meio salino aquoso. Normalmente é usado o DMSO para melhor solubilidade. Nesse foi avaliado a quantidade de massa solúvel dos extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule (Tabela 16) de *E. blanchetii* com adição de DMSO.

Tabela 16. Determinação da solubilidade dos extratos otimizados de *Eriope blanchetii* em solução aquosa de água do mar com 1% de DMSO

Extratos otimizados	Massa utilizada (g)	Resíduo obtido (g)	Volume empregado (mL)	Massa solúvel (g)	Concentração solubilizada ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Folhas	0,1012	0,0531	100	0,0481	481,0
Partes aéreas	0,1000	0,0855	100	0,0145	145,0
Caule	0,1080	0,0230	100	0,0850	850,0

Para a avaliação de letalidade dos extratos otimizados, como estimativa de toxicidade foi considerado a avaliação percentual de somatório de indivíduos mortos *Artemia salina* em diferentes concentrações contido em um volume de 10 mL. Nesse experimento foi feito em 4 replicatas de mesmas concentrações com 10 indivíduos vivos por replicatas. O percentual de mortos foi calculado com base do somatório de cada replicata por concentração avaliada considerando como significância $\alpha = 5\%$, GL=3 e valor crítico de $\chi^2 < 7,815$.

Os resultados da contagem, da soma, do percentual e o qui quadrado calculados dos indivíduos mortos encontra-se apresentados nas tabelas 17,18 e 19 correspondentes aos extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii*.

Tabela 17. Representações quantitativas de indivíduos mortos *A. salina* avaliados em diferentes concentrações de extrato otimizado de folhas de *E. blanchetii*.

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	i	ii	iii	iv	SOMA	% de mortos	χ^2
0,0	0	1	0	0	1	2,5	0,000
48,1	2	3	4	3	12	30,0	0,093
144,3	6	5	5	6	22	55,0	0,114
240,5	7	7	8	7	29	72,5	0,068
360,7	9	9	9	10	37	92,5	0,029
481,0	10	10	10	10	40	100,0	0,029

Na avaliação de extratos de folhas (Tabela 17) e partes aéreas (Tabela 18) foram observados que, em todas as concentrações o percentual de mortos *A. salina*, apresentaram valores $\chi^2 < 7,815$ como indícios de boa correlação entre os valores esperados e obtidos nesse teste.

Tabela 18. Representações quantitativas de indivíduos mortos *Artemia salina* avaliados em diferentes concentrações de extrato otimizado de partes aéreas de *Eriope blanchetii*.

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	i	ii	iii	iv	SOMA	% de mortos	χ^2
0	0	1	0	0	1	2,5	0,000
14,5	3	2	3	3	11	27,5	0,108
43,5	5	4	3	4	16	40,0	0,052
72,5	7	8	4	6	25	62,5	0,178
108,8	9	8	8	7	32	80,0	0,026
145	9	10	9	10	38	95,0	0,024

Na avaliação de extrato otimizado de caule (tabela 19) observou falta de concordância demonstrado pelo valor calculado qui quadrado em concentrações superiores a $255,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ como sendo $\chi^2 > 7,815$. Dessa forma considerou-se concentrações inferiores à $255,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ compreendidos entre 17 e $85 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pois apresentaram $\chi^2 < 7,815$.

Tabela 19. Representações quantitativas de indivíduos mortos *A. salina* avaliados em diferentes concentrações de extrato otimizado de caule de *E. blanchetii*.

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	i	ii	iii	iv	SOMA	% de mortos	χ^2
0	0	0	0	0	0	0,0	0,000
17	1	2	1	2	6	15,0	0,094
34	4	4	4	4	16	40,0	0,001
51	8	6	6	6	26	65,0	0,051
68	9	10	9	9	37	92,5	0,040
85	10	10	10	10	40	100,0	0,013
255	10	10	10	10	40	100,0	6,116
425	10	10	10	10	40	100,0	* 14,253
680	10	10	10	10	40	100,0	* 26,927
850	10	10	10	10	40	100,0	* 35,470

Obs.:* = não houve correlação entre os valores teóricos e preditos pelo teste qui-quadrado.

Com base nos valores percentuais de indivíduos mortos de *A. salina* foi realizado a representação gráfica (Figura 35) de dispersão e regressão linear dos valores aceitos pelo teste qui quadrado em relação às concentrações avaliadas dos extratos otimizados de *E. blanchetii*. Pela observação de inclinação da reta pode-se inferir que os extratos otimizados de partes aéreas e caule foram fortemente letais em relação ao extrato otimizado de folhas.

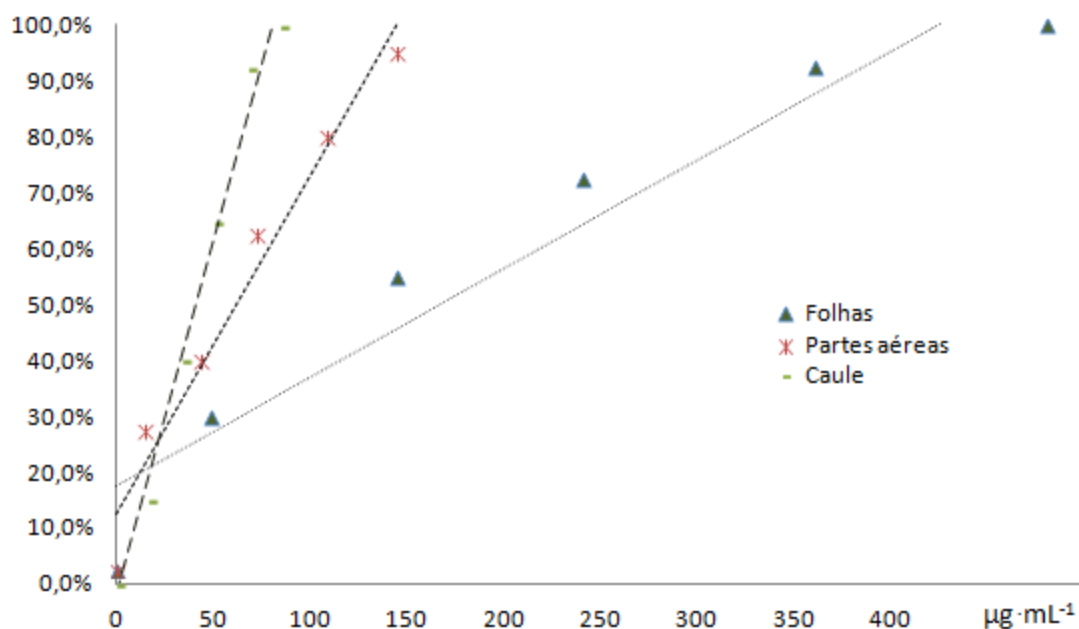


Figura 35. Regressão dos dados obtidos em extratos de folhas, partes aéreas e caule pela mistura de solventes etanol e acetato de etila 1:1

Na tabela 20 são apresentados as equações correspondentes as regressões lineares, com coeficiente de determinação e concentração letal (CL_{50}) calculados. Todos os extratos avaliados foram estimados como letais de potencial biológico como estimativa de forte atividade biológica para os extratos de partes aéreas e caule ($CL_{50} < 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e mediantemente ativo para o extrato de folhas com $CL_{50} < 1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (DAVID et al., 2001; MEYER et al., 1982).

Tabela 20. Dados pertinentes a estimativa de Concentração letal (CL_{50}) correspondentes a letalidade dos extratos otimizados de *E. blanchetii*

Extrato solúvel	Regressão Linear obtida	Coefficiente de determinação	CL_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Folhas	$y=0,0019x+0,174$ 2	$r^2=0,924$	171,4737
Partes aéreas	$y=0,0061x+0,124$ 5	$r^2=0,965$	59,2089
Caule	$y=0,0127x-0,0202$	$r^2=0,984$	30,3644

5.3.3. Avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase

A avaliação da inibição da enzima AChE consiste na medida de reação de formação de tiocolina à medida que a acetiltiocolina é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase. A quantificação da inibição da enzima é realizada através da formação de um composto colorido com banda de absorção em 405 nm. Na figura 36 está representado a reação ocorrida no método quantitativo desenvolvido por Ellman e colaboradores (1961).

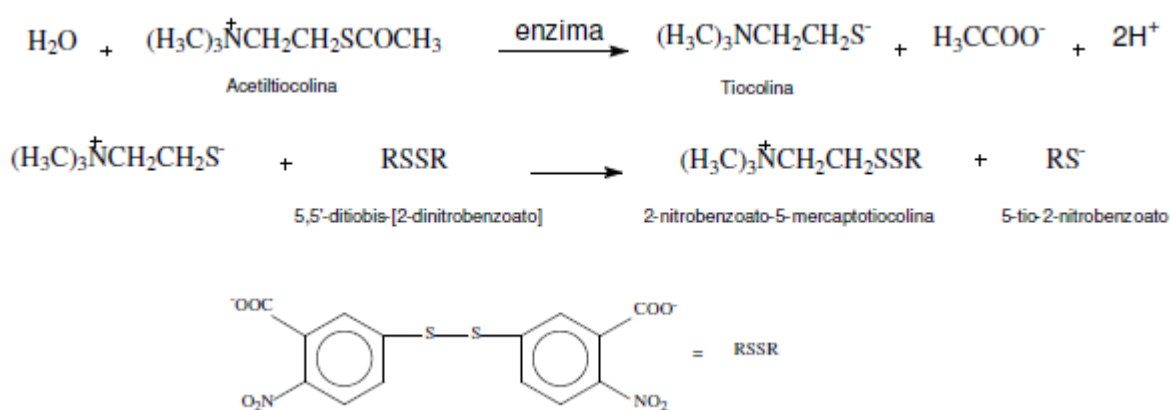


Figura 36. Reações químicas envolvidas na análise quantitativa do teste de inibição AChE desenvolvido por Ellman e colaboradores (1961). Figura adaptada e obtido por Lima (2009).

Os valores de CI_{50} obtido nas análises de extratos otimizados de *E. blanchetii* estão representados na Tabela 21, que foram determinados com base n regressão linear entre os valores obtidos pela variação de concentração de extratos e padrão de fisostigmina versus absorvância em 405 nm. Os valores de CI_{50} correspondem ao equivalente de 50 % de inibição da concentração inicial da enzima AChE. (ELLMAN et al., 1961; LIMA, 2009). O extrato otimizado de partes aéreas apresentou maior capacidade de inibição AChE conferido por $CI_{50} = 23,73 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ embora tenha apresentado menor capacidade antioxidante (tópico 5.3.1. Não foi observado correlação entre os teores de ésteres de ácidos fenólicos, tal como ácido rosmarínico em relação a avaliação inibitória AChE.

Tabela 21. Equações correspondentes à regressão linear dos padrões e dos extratos otimizados de *E. blanchetii* com os respectivos coeficientes de determinação (r^2) e CI_{50} determinados.

Amostras		Regressão linear	CI_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Padrão	Fisostigmina	$y = 0,3773x + 4,4433; r^2 = 0,9973$	14,86
Extratos	Folhas	$y = 0,1207x + 7,5329; r^2 = 0,9338$	43,30

otimizados	Partes aéreas	$y = 0,2766x - 2,4917; r^2 = 0,9880$	23,73
	Caule	$y = 0,1333x + 1,6526; r^2 = 0,9918$	44,64

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho possibilitou planejar e averiguar experimentalmente, pelo estudo *simplex-centroide*, a composição adequada de misturas de solventes etanol, acetato de etila e triclorometano com finalidade de maximização do teor de compostos fenólicos totais através da obtenção de extratos em folhas, partes aéreas e caule de *Eriope blanchetii*.

Quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais analisados nos extratos de *E. blanchetii* foram avaliados teores médios de: 8331,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (folhas), 60484,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (partes aéreas) e 35271,9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (caule). Nesses mesmos extratos foram determinados também os teores de ésteres de ácidos fenólicos em torno de: 1854,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (folhas), 358,6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (partes aéreas) e 341,8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (caule). Do ponto de vista quantitativo, os teores de ésteres de ácidos fenólicos foram significativamente menores que 10% dos teores de compostos fenólicos totais avaliados, o que indicou pouco ácido rosmarínico nessa espécie *E. blanchetii* coletada e estudada nesse trabalho. O baixo conteúdo de ácido rosmarínico foi corroborado pela análise ultra-CLAE-DAD como confirmação de poucas quantidades de ácido rosmarínico em relação aos estudos anteriores.

Na avaliação de capacidade antioxidante dos extratos de *E. blanchetii* tem-se o extrato de folhas como forte antioxidante e os extratos de partes aéreas e caule como moderados a fraco antioxidante conforme os índices de atividade antioxidante (IAA) determinados de: 2,22 (folhas), 0,52 (partes aéreas) e 0,51 (caule) com concentrações efetivas (CE_{50}) de: 646,71 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (folhas), 2281,50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Partes aéreas) e 2330,01 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (caule).

No teste de letalidade dos extratos otimizados *E. blanchetii* frente a *A. salina* foram estimados em concentrações letais (CL_{50}) de: 171,4737 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (folhas), 59,2089 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (partes aéreas) e 30,3644 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (caule). Somente os extratos de partes aéreas e de caule foram avaliados como letais de potencial biofármaco.

Foi constatado potencial de inibição enzimática AChE nos extratos otimizados de folhas, partes aéreas e caule de *E. blanchetii*, sendo que o extrato de partes aéreas, com $\text{CI}_{50} = 23,73 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em relação a comparação com o padrão de fisostigmina ($\text{CI}_{50} = 14,86 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Este trabalho contribuiu como mais um estudo químico relevante à pesquisas da área de recurso naturais no âmbito da espécie *E. blanchetii* de Salvador pertencente a biodiversidade da Mata Atlântica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

COELHO, M. S. *Otimização de múltiplas respostas na extração de metabólitos especiais de folhas secas de Eucalyptus badjensis Beuzev. & Welch, Myrtaceae, através do planejamento de misturas do tipo simplex-centroide e análise de superfície de resposta*. 2014. 94f. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2014.

DAVID, J. M.; SILVA, M. L.; DAVID, J. P.; SILVA, L. C. R. C.; SANTOS, R. A. F.; LIMA, L. S.; REIS, P. S.; FONTANA, R.. Bioactive oleanane, lupane and ursane triterpene acid derivatives. *Molecules*, v. 17, n. 10, p. 12197–205, 17 jan. 2012.

DAVID, J. P.; SILVA, E. F.; MOURA, D. L.; LENISE, M.; GUEDES, S.; ASSUNÇÃO, R. J. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. *Química nova*, v. 24, n. 6, p. 730–733, 2001.

DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 2 ed, editora West Sussex: John Wiley & Sons, 2002. 517p.

ELLMAN, G. L.; DIANE COURTNEY, K.; ANDRES, V. JR.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric of acetylcholinesterase determination. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88–95, 1961.

FAKENBERG, M.; HORTA, P. ANTUNES; LHULLIER, C. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Revista brasileira de farmacognosia*, v. 16, n. 2, p. 158–163, 2006.

FEITOSA, C. M. *Plantas medicinais e a doença de Alzheimer*. Editora Átomo. São Paulo, Campinas. p. 162.

FORIM, M. R.; MATOS, A. P.; FÁTIMA, M.; CASS, Q. B. Uso de CLAE no controle de qualidade em produtos comerciais de NIM: reprodutibilidade da ação inseticida. *Química Nova*, v. 33, n. 5, p. 1082–1087, 2010.

HELENO, S. A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: a review. *Food chemistry*, v. 173C, p. 501–513, 15 abr. 2015.

KIM, G.; PARK, Y. S.; JIN, Y.; PARK, C. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. *Appl Microbiol Biotechnol*, p. 2083–2092, 2015.

HANDA, C. L.; LIMA, F. S.; GUELFIA, M. F. G.; GEORGETTIB, S. R.; IDA, E. I. Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. *Food chemistry*, v. 197, p. 175–184, 2016.

LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*, v. 7, n. 2, p. 301–311, 2008.

LIMA, C. P. DE et al. Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis Martius*. *Acta Botânica Brasilica*, v. 25, n. 2, p. 331–336, 2011.

LIMA, L. S. *Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antioxidantes e inibição da AChE das substâncias de Cratylia mollis (Leguminosae) e Eriope blanchetii (Lamiaceae)*. 2009. 134 f. Tese (Doutorado em Química – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2009.

MARIA, C. A. BASTOS DE; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 586–592, 2004.

MEDEIROS, I. M. P. J.; SECURELLA, F. F.; SANTOS, R. C. C. S.; SILVA, K. M. R. A influência da fisioterapia na cognição de idoso com doença de Alzheimer. *Revista UNILUS Ensino e Pesquisa*, v. 55, n. 13, p. 15–21, 2016.

MEDRADO, H. H.; SANTO, E. O.; RIBEIRO, E. M. O.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; ARAUJO, J. F.; VALE, A. E.; BELLINTANI, M. C.; BRANDÃO, H. N.; MEIRA, P. R. Rosmarinic and Cinnamic Acid Derivatives of in vitro Tissue Culture of *Plectranthus ornatus*: Overproduction and Correlation with Antioxidant Activities. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 28, n. 3, p. 505–511, 2017.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. A.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Plant Research -Planta medica*, v. 45, p. 31–34, 1982.

MIRA, N. V. M.; BARROS, R. M. C.; SCHIOCCHET, M. A.; NOLDIN, J. A.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa L.*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 4, p. 994–1002, dez. 2008.

MOORES, R. G.; DOROTHY, L.; WOOD, D. K. Determination of Chlorogenic Acid in Coffee. *Analytical chemistry*, v. 20, 1948.

MORAIS, S. M.; LIMA, K. S. B.; SIQUEIRA, S. M. C.; CAVALCANTI, E. S. B.; SOUZA, M. S. T.; MENEZES, J. E. S. A.; TREVISAN, M. T. S. Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenois totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 15, n. 4, p. 575–582, 2013.

NETO, B. DE B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos - pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2 ed. ed. Campinas-SP: Editora Unicamp, 2001. 412p.

NEVES, S. P. S.; CONCEIÇÃO, A. A. Campo rupestre recém-queimado na Chapada Diamantina , Bahia , Brasil: plantas de rebrota e sementes , com espécies endêmicas na rocha. *Acta Botânica Brasilica*, v. 24, n. 3, p. 697–707, 2010.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free Radicals, Natural Antioxidants, and their Reaction Mechanisms. *Royal Society of Chemistry*, 2015.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIN, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OLIVEIRA, D. M. DE; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Química Nova*, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.

OLIVEIRA, F.; VIANA, B. F.; PIGOZZO, C. M. Floração , produção de néctar e abelhas visitantes de *Eriope blanchetii* (Lamiaceae) em dunas costeiras , *Nordeste do Brasil*. v. 97, n. 1, p. 87–95, 2007.

OSAKABE, N.; YASUDA, A.; NATSUME, M.; SANBONGI, C.; KATO, Y.; OSAWA, T.; YOSHIKAWA, T.. Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in d-galactosamine (d-GalN)-sensitized mice. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 33, n. 6, p. 798–806, set. 2002.

PAVARINI, D. P.; LOPES, N. P. A Ecologia Química e a Biossíntese dos Terpenos Voláteis das A Ecologia Química e a Biossíntese dos Terpenos Voláteis das “ Arnicas -da-Serra ” (*Lychnophora spp*) e sua quimiodiversidade na Flora Brasileira. *Revista virtual de química*, v. 8, n. 1, p. 242–261, 2016.

RIBANE, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

RUIZ, J. M.; ALARCÓN, J. M.. Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes: Evaluación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*, v. 32, n. 2, p. 8–20, 2012.

SANTOS, E. O.; LIMA, L. S.; DAVID, J. M.; MARTINS, L. C.; GUEDES, M.; LENISE, S.; DAVID, J. P. Podophyllotoxin and other aryltetralin lignans from *Eriope latifolia* and *Eriope blanchetii*. *Natural product research*, v. 25, n. 15, p. 1450–3, 15 set. 2011.

SCHEFFE, H. The Simplex-Centroid Design for Experiments with Mixtures. Journal of the Royal Statistical Society. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, v. 25, n. 2, p. 235–263, 1963.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*. v. 112, p. 654–658, 2009.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

THOMPSON, M.; ELLISON, STEPHEN L. R.; WOOD, R. Quality assurance schemes for analytical laboratories * harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (iupac technical report) harmonized guidelines for single-laboratory (IUPAC Technical Report). *International union of pure and applied chemistry*, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.