



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ISEL – INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS:
COMPARAÇÃO ENTRE MEIOS CONVENCIONAIS E FLUIDOS
SUPERCRÍTICOS**

JERSON PATRICK GOMES VEIGA
(Licenciado em Engenharia Química e Biológica)

**Trabalho Final de Mestrado para obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica**

Orientadores:

Professor Doutor José Paixão Coelho

Professor Doutor Miguel Mourato

Júri:

Presidente: Doutora Isabel Silva João

Vogal (Arguente): Doutora Marisa Fonseca Nicolai

Vogal (Orientador): Doutor José Paixão Coelho

Lisboa

Janeiro de 2017



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ISEL – INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS:
COMPARAÇÃO ENTRE MEIOS CONVENCIONAIS E FLUIDOS
SUPERCRÍTICOS**

Por

JERSON PATRICK GOMES VEIGA

Orientadores: Professor Doutor José Paixão Coelho

Professor Doutor Miguel Mourato

**Lisboa
Janeiro de 2017**

Agradecimentos

Agradeço ao Doutor José Coelho, meu professor e orientador, pelo apoio incondicional e incentivo para fazer sempre mais e melhor. Ao professor devo um agradecimento especial pelo interesse e confiança demonstrados neste trabalho. Agradeço-lhe também, pela partilha de conhecimentos nesta área de estudo em que é especialista e que constituíram contribuições valiosas para a execução deste trabalho.

Ao meu orientador, Doutor Miguel Mourato, agradeço por ter aceitado o desafio da coorientação deste trabalho.

À FCT-Fundação para a Ciência e Tecnologia e ao Centro de Química Estrutural-IST-UL, a BIC (BL-CQE/2016-002) atribuída e os apoios dados para a concretização desta tese.

À Professora Cristina Figueiredo da FCL-UL e à Doutora Maria da Conceição, CQE-IST-UL, pela utilização e análises em GC e HPLC, respetivamente.

À professora Doutora Catarina Pinto Reis e à professora Doutora Patrícia Rijo, da CBIOS, ULHT Lisboa, pelos conhecimentos transmitidos e pela oportunidade que me deram para desenvolver uma parte deste trabalho nessa Instituição.

À minha mãe e à minha avó, Silvina Gomes e Maria Augusta Gomes, a minha eterna gratidão pela compreensão, apoio e incentivo incondicionais manifestados ao longo de toda minha vida. Agradeço-lhes, em especial, pela enorme contribuição na conquista de mais esta etapa.

Aos meus irmãos, um muito obrigado pelo apoio e incentivo transmitidos, pelos momentos de stress partilhados e pela diversão que me proporcionaram ao longo da minha vida académica.

Aos meus amigos, Lucélia Silva, Miriam Santos, Edson Monteiro, Luís Gomes, Marta Alexandre, Iolanda Santos, Joana Calmeiro, Josemar Barreto, Luís Marques, Daniela Silva, Adriana Rijo, Ayewa Agognon e Maria João Picado, muito obrigado pelo apoio e incentivo ao longo deste mestrado.

Ao CIEQB e ao ISEL e a todos os seus colaboradores, fica a minha gratidão pela oportunidade e pelas condições disponibilizadas ao longo da minha caminhada neste Instituto.

“Mais triste que perder alguém que a gente ama? Só se a gente perdesse a memória”
Adriana Falcão

Eternamente agradecido por tudo, “Pai.” — Em memória de José Antonio Gomes

Resumo

A importância dos compostos de origem natural, com potencialidades nutricionais, nutracêuticas e farmacológicas para indústrias, como a alimentar, cosmética ou farmacêutica, tem vindo a adquirir uma maior relevância nos nossos dias.

Na procura de extratos naturais com propriedades antioxidantes, antimicrobianas, não tóxicas ou com propriedades na inibição de enzimas, como indicadores para o tratamento de doenças, efetuou-se a extração em Soxhlet (MeOH; EtOH e hexano) para a palmeira anã e manjeriço, sendo que no manjeriço a extração supercrítica com CO₂ (400 bar e 333,15 K), foi igualmente realizada como técnica alternativa aos solventes orgânicos. Os compostos voláteis do manjeriço, no óleo essencial e no óleo volátil, foram obtidos por hidrodestilação e extração supercrítica a 90 bar e 333,15 K, respetivamente.

Avaliou-se a capacidade antioxidante dos extratos, pelo método do radical DPPH, radical catião ABTS, poder de redução do ião Fe³⁺, teor de polifenóis e de flavonóides. Verificou-se que os extratos da palmeira anã apresentaram valores superiores quando comparados com os obtidos para os extratos de manjeriço.

Avaliou-se ainda a atividade antimicrobiana dos extratos em 6 estirpes: duas bactérias gram-positivas (*S. aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATCC 29212), duas bactérias gram-negativas (*P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922) e duas leveduras (*S. cerevisiae* ATCC 9763 e *C. albicans* ATCC 10231), não tendo sido encontrada atividade relevante. A toxicidade geral foi avaliada numa linha de célula mamária humana MCF7 e a atividade enzimática, nomeadamente a capacidade de inibição da AChE e da TyrE, foram igualmente testadas. Os valores para a toxicidade dos extratos são muitos baixos, verificando-se, ainda, que não inibiam significativamente as enzimas testadas.

A caracterização do extrato da palmeira anã foi efetuada por HPLC-DAD-MS, tendo sido identificados um total de 13 compostos, maioritariamente derivados de C- e O- luteolinas. O óleo essencial e o óleo volátil do manjeriço foram caracterizados por GC-MS e GC-Fid, tendo sido identificados como compostos maioritários: 1,8-cineol, linalol, metil chavicol, metil eugenol e eugenol. No tratamento de resultados, recorreu-se a testes estatísticos ANOVA e aos testes de Tukey e Scheffé.

Os resultados obtidos para os diferentes extratos são promissores para futuras aplicações como nutracêuticos, considerando a suas potencialidades como antioxidantes e não tóxicos.

Palavras-chave: palmeira anã, manjeriço, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, atividade enzimática, GC-MS e HPLC-MS.

Abstract

The importance of natural compounds with nutritional, nutraceutical properties and pharmacological potential for industries such as food, cosmetics or pharmaceuticals, has arisen to acquire greater relevance in our day.

In search of natural extracts with antioxidant properties, antimicrobial, non-toxic or inhibit enzymes properties as indicators for the treatment of diseases, it is carry out the Soxhlet extraction (MeOH; ETOH and hexane) to Dwarf palm and basil, and in the case of the basil, extraction with supercritical CO₂ (400 bar and 333.15 K), was also performed as an alternative technique to organic solvents. The volatile compounds of basil, essential oil and the volatile oil, were obtained by hidrodestilation and supercritical extraction to 90 bar and 333.15 K, respectively.

The antioxidant capacity of extracts was evaluated, by the DPPH radical method, cation radical ABTS, reduction of Fe³⁺, polyphenols and flavonoid content. The Dwarf palm extracts presented higher values when compared with those obtained for the extracts of Basil.

The antimicrobial activity of extracts was evaluated in 6 strains: two Gram-positive bacteria (*S. aureus* ATCC 25923 *E. faecalis* ATCC 29212 and), two gram-negative bacteria (*P. aeruginosa* ATCC 27853, and *E. coli* ATCC 25922) and two yeasts (*S. cerevisiae* species ATCC 9763 and *C. albicans* ATCC 10231), No relevant activity was achieved. The general toxicity was verified in a human mammary cell line MCF7 and enzymatic activity including the ability to inhibit AChE and TyrE was also tested. The toxicity values obtained for the extracts are very low, there still not inhibit the enzymes tested.

The characterization of the dwarf palm extract was performed by HPLC-DAD-MS has been identified a total of 13 compounds, majority derivatives of C- and O luteolin. The essential oil and volatile oil Basil, were characterized by GC-MS and GC-Fid were identified as major compounds: 1,8-cineole, linalool, methyl chavicol, methyl eugenol and eugenol. Statistical ANOVA, Tukey and Scheffe tests were used to the results.

The results obtained for the various extracts are promising to future applications such as in nutraceuticals, considering its potential as antioxidants and non-toxic.

Keywords: dwarf palm, basil, antioxidant activity, antimicrobial activity, enzymatic activity, GC-MS and HPLC.MS.

Glossário e Abreviaturas

AAPH	– dihidrocloreto de α,α' -azodiisobutiramidina
ABTS	– 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ACh	– acetilcolina
AChE	– acetilcolinesterase
BHA	– butil-hidroxianisol
BHT	– butil-hidroxitolueno
CO ₂	– dióxido de carbono
CMI	– concentração mínima inibitória
CML	– concentração máxima letal
DA	– Doença de <i>Alzheimer</i>
DMSO	– dimetilsulfóxido
DNA	– ácido desoxirribonucléico
DNTB	– ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
DPPH	–1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
EAG	– equivalente ácido gálico
EC	– equivalente catequina
ESC	– extração supercrítico
ESI	– <i>electrospray</i>
EtOH	– etanol
FRAP	– <i>Poder antioxidante</i> por redução do ião <i>férrico</i> (<i>ferric reducing antioxidant power</i>)
FSC	– fluídos supercríticos
GC-MS	– Cromatografia gasosa com espectrofotómetro de massa
HPLC-DAD	– cromatografia líquida de alta resolução com detetor foto dígodo
HPLC-MS	– cromatografia líquida de alta performance com espectrofotómetro de massa
HEPES	– ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfónico

IC50	– concentração inibitória média
MeOH	– metanol
MTC	– medicina tradicional chinesa
OMS	– organização mundial de saúde
ORAC	– <i>capacidade de absorção dos radicais oxigenados (Oxygen radical absorbance capacity)</i>
PBS	– tampão fosfato
P _c	– pressão crítica
PFRAP	– Redução do Ferrocianeto de Potássio pelos antioxidantes e reação subsequente do Ferrocianeto de Potássio com Fe ⁺³
PG	– propil galato
ROS	– espécies reativas de oxigénio
TEAC	– capacidade antioxidante equivalente ao trolox (<i>trolox equivalent antioxidant capacity</i>)
T _c	– temperatura crítica
TBHQ	– terc-butilhidroquinona
TRAP	– atividade <i>antioxidante total em captura do radical livre (total radical trapping antioxidant)</i>
Trolox	– ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano
TyrE	– tirosinase
UTAD	– Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

ÍNDICE

Agradecimentos.....	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Glossário e Abreviaturas.....	ix
ÍNDICE	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
ÍNDICE DE TABELAS.....	xix
I – INTRODUÇÃO	1
I.1 – Descrição geral da palmeira anã - <i>Chamaerops humilis</i> L.....	3
I.2 – Descrição geral do manjeriço – <i>Ocimum basilicum</i>	4
II – MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NAS PLANTAS	7
II.1 – Métodos convencionais	8
II.2 – Métodos não convencionais	8
III – MÉTODOS DE ANÁLISE	11
III.1 – Atividade Antioxidante	11
III.2 – Atividade Antimicrobiana e Toxicidade Geral.....	15
III.3 – Inibição Enzimática.....	17
III.3.1 – Acetilcolinesterase (AChE).....	18
III.3.2 – Tirosinase (TyrE)	19
III.4 – Análise por GC-MS e HPLC-MS.....	21
IV – PARTE EXPERIMENTAL	23
IV.1 – Recolha, processamento e armazenamento das amostras vegetais da Palmeira Anã - <i>Chamaerops humilis</i> L e Manjeriço – <i>Ocimum basilicum</i>	23
IV.2 – Obtenção dos extratos da Palmeira Anã e Manjeriço	23
IV.2.1 – Extração em Soxhlet.....	23
IV.2.2 – Hidrodestilação.....	24

IV.2.3 – Extração supercrítica	25
IV.3 – Avaliação da atividade antioxidante dos extratos da Palmeira Anã e do Manjeriço	27
IV.3.1 – Determinação do teor total em polifenóis - Convencional	28
IV.3.2 – Determinação do teor total em polifenóis - Microplaca.....	29
IV.3.3 – Determinação do teor total em flavonóides.....	30
IV.3.4 – Método de radical livre DPPH	31
IV.3.5 – Método radical catião ABTS . +	31
IV.3.6 – Poder de redução do ião Fe3 +	32
IV.4 – Atividade microbiana e Toxicidade geral	33
IV.4.1 – Atividade microbiana	33
IV.4.2 – Toxicidade geral	34
IV.5 – Inibição enzimática.....	34
IV.5.1 – Inibição de Acetilcolinesterase (AChE)	34
IV.5.2 – Inibição de Tirosinase (TyrE)	35
IV.6 – Análise por GC-MS e HPLC-DAD-MS.....	36
IV.6.1 – GC e GC-MS	36
IV.6.1.1 – Cromatografia Gasosa	36
IV.6.1.2 – Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massa	36
IV.6.2 – HPLC-DAD-MS.....	37
IV.7 – Análise estatística e tratamento de dados	37
V – RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
V.1 – Obtenção de extratos de palmeira anã, manjeriço e óleo essencial de manjeriço, por extração em Soxhlet e hidrodestilação	39
V.2 – Obtenção de extratos de manjeriço e óleo volátil por extração supercrítica com CO ₂	40
V.3 – Avaliação de atividade antioxidante	42
V.3.1 – Determinação de polifenóis – Método Convencional vs. Microplaca.....	42
V.3.1.1 – Determinação dos polifenóis e flavonóides nos extratos do manjeriço	46

V.3.2 – Determinação da atividade antioxidante do extrato da palmeira anã	50
V.3.3 – Determinação da atividade antioxidante dos extratos do manjeriço	55
V.4 – Avaliação da atividade antimicrobiana e toxicidade geral de extratos da palmeira anã e do manjeriço.....	58
V.4.1 – Atividade antimicrobiana.....	58
V.4.2 – Toxicidade geral	61
V.5 – Avaliação da atividade enzimática dos extratos da palmeira anã e manjeriço.....	62
V.5.1 – Inibição de acetilcolinesterase	62
V.5.2 – Inibição de tirosinase	63
V.6 – Análise por GC-MS e HPLC-MS	64
V.6.1 – Análise por GC-MS de óleos essenciais de manjeriço.....	64
V.6.2 – HPLC-MS	67
V.6.2.1 – Caracterização da composição em compostos fenólicos da palmeira anã com HPLC-DAD-MS/MS	67
VI – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	75
VII – BIBLIOGRAFIA.....	77
VIII – ANEXOS	85
Anexo A - Curva de calibração de ácido gálico, para a determinação do teor em polifenóis pelo método convencional a 765 nm.....	85
Anexo C - Curva de calibração da catequina, para a determinação do teor de flavonóides a 510 nm.....	86
Anexo D - Curva de calibração de trolox, para a determinação do teor do poder de redução do Fe ³⁺ a 655 nm.	86
Anexo E – Parâmetros das retas utilizadas na determinação de IC50 do extrato da palmeira anã, no ensaio de DPPH e ABTS.	87
Anexo F – Parâmetros das retas utilizadas na determinação de IC50 dos extratos do manjeriço, no ensaio de DPPH e ABTS.....	88
Anexo G – Representação gráfica dos ensaios de DPPH com os extratos de manjeriço... ..	89
Anexo H – Representação gráfica dos ensaios de ABTS com os extratos de manjeriço. ...	90

Anexo I – Representação do rendimento da extração supercrítica do manjeriço a 333,15 K e 400 bar, com e sem óleo volátil,.....	92
Anexo J – Divulgação do trabalho realizado para a comunidade científica.	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Palmeira anã e a sua distribuição em Portugal, fonte: Jardim botânico UTAD.	3
Figura 2- Manjeriçã.	5
Figura 3- Exemplo de categorias de compostos bioativos presentes nas plantas.	7
Figura 4- Exemplos de espécies reativas de oxigénio e azoto.	11
Figura 5- Esquema da catálise da acetilcolina	18
Figura 6- Exemplo de fármacos utilizados como inibidores de enzimas.	19
Figura 7- Ácido kógico, inibidor da tirosinase.	20
Figura 8- Sistema geral de GC-MS e HPLC-MS Adaptado de Kicman, Parkin, and Iles (2007).	21
Figura 9- Esquema de extração em Soxhlet	24
Figura 10- Esquema de hidrodestilação com um <i>Clevenger</i>	24
Figura 11- Esquema representativo do equipamento de extração supercrítica	25
Figura 12- Valores de teores em polifenóis, determinados em mg EAG/g de extrato, pelo método convencional a 765 nm. Letras iguais indicam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P<0,05$).	43
Figura 13- Valores de teores em polifenóis, determinados em mg EAG/g de extrato, pelo método de microplaca a 655 nm. Letras iguais indicam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P<0,05$).	44
Figura 14- Comparação do teor de polifenóis determinado pelos dois métodos. Letras iguais significam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P<0,05$).	45
Figura 15- Valores de teor em flavonóides para o extrato metanólico das folhas da palmeira anã. Letras iguais indicam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P<0,05$).	46
Figura 16- Teor em polifenóis dos extratos de manjeriçã em Soxhlet, determinado por método de microplaca. Letras iguais indicam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P<0,05$).	47

-
- Figura 17-** Teor de polifenóis nos extratos de manjeriço, comparação entre Soxhlet (folhas secas) e ESC. Letras iguais significam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P < 0,05$)..... 48
- Figura 18-** Teor de flavonóides dos extratos de manjeriço em Soxhlet, determinados pelo método de microplaca. Letras iguais significam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P < 0,05$)..... 49
- Figura 19-** Teor de flavonóides dos extratos de manjeriço, comparação o Soxhlet (folhas secas) e ESC, determinado pelo método de microplaca. Letras iguais significam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P < 0,05$)..... 50
- Figura 20-** Curvas de inibição para o extrato metanólico da palmeira anã e dos compostos de referências (trolox e ácido ascórbico), no ensaio de DPPH..... 51
- Figura 21-** Retas obtidas para o extrato metanólico da palmeira anã e dos compostos de referência (trolox e ácido ascórbico), no ensaio de DPP, considerando a zona da linearidade. 52
- Figura 22-** Curvas de inibição para o extrato metanólico da palmeira anã e dos compostos de referências (trolox e ácido ascórbico), no ensaio de ABTS. 52
- Figura 23-** Retas obtidas para o extrato metanólico da palmeira anã e dos compostos de referência (trolox e ácido ascórbico), no ensaio de ABTS, considerando a zona da linearidade. 53
- Figura 24-** Resultados da avaliação do poder de redução do extrato metanólico da palmeira anã. 54
- Figura 25-** Poder de redução dos estratos obtidos em Soxhlet fresco e seco do manjeriço, expressos em $\mu\text{mol TEAC/g}$ extrato. Letras iguais significam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P < 0,05$)..... 56
- Figura 26-** Comparação do poder de redução dos estratos obtidos em Soxhlet do manjeriço seco com os extratos supercríticos, expressos em $\mu\text{mol TEAC/g}$ extrato. Letras iguais significam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P < 0,05$). 57
- Figura 27-** Efeito dos extratos de palmeira anã e de manjeriço no crescimento de *Pseudomona aeruginosa*, pelo método de difusão em poço, 24 h de incubação a 37 °C. Legenda: 1- Extrato metanólico da palmeira anã; 2- Extrato metanólico de manjeriço seco; 3- Extrato etanólico de manjeriço seco; 4- ESC CO₂ 400:60 sem óleo; 5- ESC CO₂ 400:60; controlo negativo DMSO e controlo positivo Norfloxacina. 58

- Figura 28-** Efeito dos extratos de palmeira anã e manjerição no crescimento de *Escherichia coli*, pelo método de difusão em poço, 24 h de incubação a 37 °C. Legenda: 1- Extrato metanólico de palmeira anã; 2- Extrato metanólico de manjerição seco; 3- Extrato etanólico de manjerição seco; 4- ESC CO₂ 400:60 sem óleo; 5- ESC CO₂ 400:60; controlo negativo DMSO e controlo positivo Norfloxacin. 59
- Figura 29-** Efeito dos extratos de palmeira anã e manjerição no crescimento de *Enterococcus faecalis*, pelo método de difusão em poço, 24 h de incubação a 37 °C. Legenda: 1- Extrato metanólico de palmeira anã; 2- Extrato metanólico de manjerição seco; 3- Extrato etanólico de manjerição seco; 4- ESC CO₂ 400:60 sem óleo; 5- ESC CO₂ 400:60; controlo negativo DMSO e controlo positivo Vancomicina. 59
- Figura 30-** Efeito dos extratos de palmeira anã e manjerição no crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*, pelo método de difusão em poço, 24 h de incubação a 37 °C. Legenda: 1- Extrato metanólico de palmeira anã; 2- Extrato metanólico de manjerição seco; 3- Extrato etanólico de manjerição seco; 4- ESC CO₂ 400:60 sem óleo; 5- ESC CO₂ 400:60; controlo negativo DMSO, controlo positivo Vancomicina para *Staphylococcus aureus* e Nystatina para *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. 60
- Figura 31-** Viabilidade celular de culturas de células MCF7 expostas a diferentes concentrações dos extratos metanólico de manjerição e metanólico de palmeira anã, avaliada pelo ensaio Violeta de Cristal. Os resultados (media ± DP) são apresentados como percentagens calculadas relativamente ao controlo negativo (100%). 61
- Figura 32-** Resultados da inibição da AChE, de acordo com a reação de Ellman's. 62
- Figura 33-** Resultados da inibição da TyrE. 63
- Figura 34-** Espectro de HPLC-DAD-MS/MS obtido para o extrato metanólico das folhas da palmeira anã. 67
- Figura 35-** Identificação do pico 9, orientina (luteolina-8-C-glicósido). 69
- Figura 36-** Identificação do pico 13, tricina-7-O-neohesperidosido. 70
- Figura 37-** Curva de calibração do ácido gálico usado na determinação do teor de polifenóis. 85
- Figura 38-** Curva de calibração de ácido gálico, utilizado na determinação de teor de polifenóis pelo método de microplaca. 85
- Figura 39-** Curva de calibração da catequina para a determinação do teor em flavonóides. 86
- Figura 40-** Curva de calibração do trolox, para a determinação do poder de redução. 86

Figura 41- Ensaio de DPPH com os extratos metanólicos do manjeriçãõ.	89
Figura 42- Ensaio de DPPH com os extratos etanólicos do manjeriçãõ.	89
Figura 43- Ensaio de DPPH com os extratos supercríticos do manjeriçãõ.	90
Figura 44- Ensaio de ABTS com os extratos metanólicos do manjeriçãõ.	90
Figura 45- Ensaio de ABTS com os extratos etanólicos do manjeriçãõ.	91
Figura 46- Ensaio de ABTS com os extratos supercríticos do manjeriçãõ.	91
Figura 47- Rendimentos da extraçãõ supercrítica do manjeriçãõ, com e sem óleo volátil. ...	92

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Classificação taxionômica da Palmeira anã, fonte: Jardim botânico UTAD.....	3
Tabela 2- Classificação taxionômica do manjeriço, adaptado de (Khair-ul-Bariyah, Ahmed, and Ikram 2012).....	5
Tabela 3- Vários métodos analíticos de avaliação da capacidade antioxidante, adaptado de (Pisoschi and Negulescu 2011)	13
Tabela 4- Rendimentos obtidos na extração por Soxhlet (manjeriço e palmeira anã) e na hidrodestilação do manjeriço.	39
Tabela 5- Rendimento obtido da extração supercrítica com CO ₂ , do material vegetal do manjeriço (folhas secas) a uma temperatura de 333,15 K e pressão de 400 bar.	41
Tabela 6- Rendimento obtido da extração supercrítica com CO ₂ , do material vegetal do manjeriço (folhas secas) a uma temperatura de 333,15 K pressão de 90 bar.....	41
Tabela 7- Rendimento obtido da extração supercrítica com CO ₂ , do material vegetal do manjeriço (folhas secas) a uma temperatura de 333,15 K e pressão de 400 bar, após uma extração prévia do óleo volátil a uma temperatura de 333,15 K e pressão de 90 bar.....	42
Tabela 8- Valores de IC50 (mg/mL) do extrato metanólico da palmeira anã e dos compostos de referência.....	53
Tabela 9- Valores de IC50 (mg/mL) dos extratos do manjeriço e dos compostos de referências.....	55
Tabela 10- Composição de óleos essenciais e ceras, isolados do manjeriço por hidrodestilação e ESC.	65
Tabela 11- Quadro de resumo dos 13 compostos identificados por HPLC-DAD-MS/MS.....	71
Tabela 12- Parâmetros de ajustes das retas utilizadas na determinação de IC50, nos ensaios de DPPH e ABTS do extrato da palmeira anã.	87
Tabela 13- Parâmetros de ajustes das retas utilizadas na determinação de IC50, nos ensaios de DPPH e ABTS do extrato da palmeira anã.	88

I – INTRODUÇÃO

As plantas aromáticas e medicinais têm um valor importante no dia-a-dia de muitas sociedades. Quase todas as culturas e civilizações, desde os tempos mais antigos até aos dias de hoje, têm dependido total ou parcialmente da aplicação e utilização destas plantas à medicina tradicional, devido à disponibilidade, acessibilidade, aceitabilidade e eficácia (Benmehdi et al. 2012; Hasnaoui et al. 2013).

Historicamente, as plantas têm sido uma fonte de obtenção de compostos e novos fármacos, com grandes contribuições para a saúde humana e seu bem-estar. Todas as partes das plantas podem ser utilizadas, desde raízes, caule, folhas, flores, frutos e sementes. As doenças tratadas pela fitoterapia são muito diversificadas e podem ir de uma simples gripe a doenças crónicas (Hasnaoui et al. 2013).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2008, mais de 80% da população do mundo dependia da medicina tradicional para cuidados de saúde primária. Em África, cerca de 70% da população usa a medicina tradicional, quer devido às crenças, quer pela extrema pobreza que se verifica em grande parte deste continente. As plantas medicinais mais utilizadas no continente africano são: *Ammoides verticillata*, *Thymus ciliatus*, *Thymus capitatus*, *Myrthus communis*, *Eucalyptus globulus*, *Ceratonia siliqua*, *Inula viscosa*, *Mentha piperita*, *Mentha puleium*, *Malva sylvestris*, *Marrubium vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula stoechas* e *Olea europea* (Benmehdi et al. 2012; Hasnaoui et al. 2013; A.Ahmed et al. 2015).

Segundo a OMS, a medicina tradicional é a soma total dos conhecimentos, habilidades e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas, sendo explicáveis ou não, usadas na manutenção da saúde, bem como na prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de doenças físicas e mentais. A OMS, em resposta à resolução da Assembleia Mundial da Saúde sobre a medicina tradicional, desenvolveu uma estratégia de medicina tradicional para o período 2014-2023. Em alguns países, a medicina tradicional ou a medicina não convencional pode ser denominada medicina complementar.

A medicina tradicional é uma prática já milenar, estando relacionada com o contexto social e cultural de uma comunidade, podendo ser diferente de comunidade para comunidade (Okigbo, Anuagasi, and Amadi 2009). Por vezes, as plantas utilizadas bem como as informações sobre os seus efeitos benéficos são mantidas em segredo, havendo poucos dados que permitam ajuizar da sua importância medicinal (Fabricant and Farnsworth 2001). Contudo, a Medicina Tradicional Chinesa (MTC), uma das mais antigas práticas de medicina tradicional, com mais de 2500 anos, é um sistema mais definido e organizado. Tem sido

utilizado com sucesso para diagnosticar, tratar e prevenir doenças (Fabricant and Farnsworth 2001; Okigbo, Anuagasi, and Amadi 2009).

Assim, a utilização de plantas medicinais tem-se apresentado como uma mais-valia para o desenvolvimento de novos fármacos, pois são fontes de matéria-prima renováveis e apresentam-se como uma fonte ilimitada de novas e complexas estruturas. Por outro lado, muitas vezes os compostos isolados das plantas sujeitas a um estudo e caracterização, apresentam-se como mais seguros do que os mesmos sintetizados ou obtidos de plantas sem histórico (Balunas and Kinghorn 2005; Fabricant and Farnsworth 2001).

Neste trabalho, analisaram-se diferentes extratos obtidos de duas plantas medicinais que se encontram presentes no dia-a-dia da sociedade em geral — a palmeira anã, ***Chamaerops humilis* L.** e o manjericão, ***Ocimum basilicum*** — nomeadamente, as suas características antioxidantes, antimicrobianas, toxicidade, inibição de enzimas e a identificação dos compostos maioritários, por técnicas de GC e HPLC, acopladas a diferentes detetores, com o objetivo de verificar as potencialidades dos extratos e sua utilização.

I.1 – Descrição geral da palmeira anã - *Chamaerops humilis* L.

A palmeira anã é uma planta que pertence à família *Arecaceae*, a qual dispõe de 200 géneros e 3000 espécies. É frequentemente encontrada no Norte de África, especialmente na parte ocidental do Mediterrâneo. Esta planta pode crescer entre 1 a 1,5 m de altura em média, sendo que em local protegido pode atingir alturas entre 9 a 10 m. (Melro et al. 1993, Benmehdi et al. 2012; Hasnaoui et al. 2013).

Em Portugal, a palmeira anã é utilizada maioritariamente em jardinagem, encontrando-se distribuída pelo país em geral, mas é mais frequente no litoral de Alentejo e no Algarve.



Figura 1- Palmeira anã e a sua distribuição em Portugal, fonte: Jardim botânico UTAD.

Tabela 1- Classificação taxionómica da Palmeira anã, fonte: Jardim botânico UTAD.

<i>Reino</i>	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Liliopsida</i>
Ordem	<i>Arecales</i>
Família	<i>Arecaceae</i>
Género	<i>Chamaerops</i>
Nome comum	Palmeira-das-vassouras, palmeira-anã, palmeira- vassoureira
Nome científico	<i>Chamaerops humilis</i> L

Esta planta apresenta caules grossos e fibrosos, folhas em forma de leque, as flores são amarelas e geralmente unissexuais, estão dispostas em espadices muito ramificadas, protegidas por duas a quatro espadas castanho-avermelhadas e os frutos são

fibrosos-carnudos. (Melro et al. 1993). A nível alimentar, há referência da utilização dos frutos. (Melro et al. 1993; Benmehdi et al. 2012)

Como planta medicinal, diversas referências podem ser encontradas na literatura, (Allali et al. 2008; Beghalia et al. 2008), no tratamento de doenças como a diarreia e a diabetes. No tratamento da diabetes, o seu extrato aquoso, obtido das folhas, possui efeito hipoglicémico (Benmehdi et al. 2012; Hasnaoui et al. 2013). Outros autores referem ainda propriedades como a atividade anti-inflamatória, anabolizante e diurética (Beghalia et al. 2008; Bellakhdar et al. 1991), além da atividade antioxidante de extratos metanólicos e hidroalcolicos das folhas (Hasnaoui et al. 2013; Miguel et al. 2014).

A informação relativa aos constituintes químicos da palmeira anã é rara, e os trabalhos existentes pouco conclusivos. Estudo realizado com óleo essencial extraído de uma variedade marroquina, obtida através de destilação num *Clevenger*, permitiu a identificação por cromatografia gasosa com espetrometria de massa (GC-MS) de quatro componentes principais: (E)- β -ocimeno (39,36%) ciclobutano, 1,2-bis(1-methiletenyl)-, trans- (4,51%), ciclohexanona, 5-metil-2-(1-metiletilideno) (4,17%) (Saïd et al. 2013) .

Mais recentemente, estudos com uma variedade marroquina de palmeira anã, recolhida em Benslimane (centro de Marrocos), por análise do óleo essencial obtido da destilação das folhas num *Clevenger*, permitiu identificar 15 compostos por GC-MS. Alguns dos compostos são: espatulenol (25.49 %); ácido palmítico (14.37 %); beta.-eudesmol (9.19 %); óxido de cariofileno (5.23 %), octadecanal(5.16 %) e fitol(4.16 %) (Khoudali, Essaqui, and Dari 2016).

1.2 – Descrição geral do manjeriço – *Ocimum basilicum*

O manjeriço é uma planta aromática, pertencente à família *Lamiacecae*, usada tanto como erva culinária como para fins ornamentais. O género *Ocimum* contém entre 50 a 150 espécies de plantas, encontradas nas regiões tropicais da Ásia, África, América de Sul e Central. O manjeriço é considerado como nativo nas partes mais quentes das regiões Indo-Malaias. Cresce em habitats de terrenos baldios, mas devido à sua importância ornamental e terapêutica, também é cultivado (Avanmardi et al. 2002; Ismail 2006; Ijaz et al. 2008; Zheljazkov et al. 2008; Dev et al. 2011; Marwat et al. 2011; Khair-ul-Bariyah, Ahmed, and Ikram 2012; Ch et al. 2015; El-Azim et al. 2015; El-soud et al. 2015).

Tabela 2- Classificação taxionômica do manjericão, adaptado de (Khair-ul-Bariyah, Ahmed, and Ikram 2012).

<i>Reino</i>	Plantae
Filo	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordem	<i>Lamiales</i>
Família	<i>Lamiaceae</i>
Gênero	<i>Ocimum</i>
Espécie	<i>Basilicum</i>
Nome científico	<i>Ocimum basilicum</i>

O manjericão é uma planta de tamanho médio, possui um forte perfume, folhas opostas, inteiras e ovais, que são muitas vezes onduladas; atinge de 3 a 5 cm de comprimento e o pecíolo é fino. As flores têm entre 8-12 mm de comprimento em círculos de *conjuntos* de 6 a 10 flores. (Khair-ul-Bariyah, Ahmed, and Ikram 2012).



Figura 2- Manjericão.

Tradicionalmente, o manjericão tem sido utilizado na medicina tradicional no tratamento de problemas como dores de cabeça, tosse, diarreia, verrugas e deficiente funcionamento renal. É vasta a lista de autores que referenciam o manjericão como sendo uma planta medicinal (Avanmardi et al. 2002; Ismail 2006; Ijaz et al. 2008; Zheljzakov et al. 2008; Dev et al. 2011; Marwat et al. 2011; Barbalho et al. 2012; Ch et al. 2015; El-Azim et al. 2015; El-soud et al. 2015;).

O manjericão é uma planta que possui um enorme espectro de atividades farmacológicas. O extrato e óleo essencial de várias partes do manjericão (folhas, flores, raiz, etc), tem sido

utilizado na determinação da sua atividade antimicrobiana, antioxidante, anticâncer, antidiabético, anti-inflamatória, antistress, analgésico, sedativo, e hipoglicêmico, sendo os resultados obtidos bastante bons (Avanmardi et al. 2002; Ijaz et al. 2008 ; Dev et al. 2011; Khair-ul-Bariyah, Ahmed, and Ikram 2012; Ch et al. 2015; El-Azim et al. 2015; El-soud et al. 2015).

Contrariamente à palmeira anã, o estudo do manjeriço já se encontra mais aprofundado e as informações acerca da sua constituição conhecida. Segundo Ismail (2006), a análise do óleo essencial obtido a partir da hidrodestilação das folhas do manjeriço, durante 4 horas num *Clevenger*, permitiu identificar por GC-MS a presença dos seguintes compostos: linalol (44.18%), 1,8-cineol (13.65%), eugenol (8.59%), metil cinamato (4.26%), iso cariofileno (3.10%), e α -cubebeno (4.97%). Num outro estudo, efetuado por El-Azim et al. (2015), identificou-se por GC-MS a presença de linalol (33.9%), eugenol (8.31%) e 2,6-Dimetil-6-(4-metil-3-pentenil) -biciclo[3.1.1]hepta-2-eno (8.04%) como sendo os componentes químicos mais abundantes no óleo volátil extraído de folhas secas de manjeriço.

Autores como, (Dev et al. 2011) estudaram a constituição química de vários extratos de folhas de manjeriço, tendo identificado como compostos maioritários, nomeadamente no extrato de hexano: 1,2-dimetoxi-4-(2-propenil)benzeno(35.82%), 2- pentanona (27.06%), oxido de cariofileno (4.64%), anidrido acético (4.32%), oxido de aromadendreno (1.16%) e 1,3-benzodioxido (0.59%); no extrato de acetato de etilo: 1,2-dimetoxi-4-(2-propenil)benzeno (53.06%), 2- pentanona (18.06%), 4-metil-2-pentil acetato(3.11%), oxido de aromadendreno (1.16%) e oxido de cariofileno (1.44%) e para extrato de clorofórmio: eugenol (88.18%), ácido 1, 2-benzenodicarboxílico (3,49%) e 2-metoxi-4- (propil) - (E) -fenol (1,46%).

II – MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NAS PLANTAS

O estudo qualitativo e quantitativo de compostos bioativos, presentes em amostras de plantas dependem da seleção da técnica adequada do método de extração. A extração é um dos primeiros passos no estudo de plantas medicinais, desempenha um papel significativo e crucial no resultado final. Para além da escolha do solvente, de importância primordial, os fatores mais comuns que afetam a eficiência de processos de extração são: a propriedade da matriz da planta, a temperatura, a pressão e o tempo. A escolha do solvente, que tem que ter em conta a polaridade do composto alvo; a afinidade molecular entre soluto e solvente; a transferência de massa, a segurança ambiental, a toxicidade, não esquecendo, ainda, a viabilidade financeira do mesmo (Gurib-fakim 2006; Jin Dai and Mumper 2010; Azmir et al. 2013).

Usualmente, a extração dos compostos bioativos é efetuada em conjunto com outros componentes presentes nas plantas. Estes podem ser extraídos a partir de várias partes da planta: raiz, folha, fruto, caule, flores e frutas (Azmir et al. 2013).

Os compostos do sistema biológico podem ser divididos em dois grandes grupos: metabolitos primários e metabolitos secundários. Os metabolitos primários são substâncias químicas que visam o crescimento e o desenvolvimento, tais como hidratos de carbono, lípidos, aminoácidos e proteínas, sendo que os compostos bioativos de plantas são produzidos como metabolitos secundários. (Azmir et al. 2013).

De acordo com Croteau et al. (2000) os compostos bioativos de plantas são divididos em três categorias principais: (a) terpenos e terpenóides (cerca de 25.000 tipos), (b) alcaloides (aproximadamente 12.000 tipos) e (c) compostos fenólicos (aproximadamente 8000 tipos) (Azmir et al. 2013).

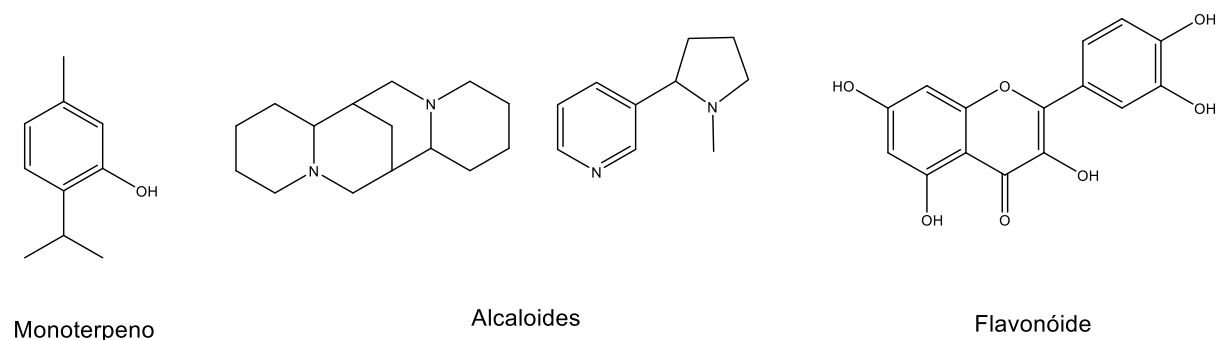


Figura 3-Exemplo de categorias de compostos bioativos presentes nas plantas.

A obtenção dos extratos vegetais pode ser feita recorrendo a várias técnicas de extração clássicas. Muitas destas técnicas baseiam-se na extração por diferentes solventes, utilização e aplicação de calor, ultrassons e micro-ondas. Estas técnicas estão divididas em dois grandes grupos: métodos convencionais e métodos não convencionais (Ibañez et al. 2012; Azmir et al. 2013).

II.1 – Métodos convencionais

Os métodos convencionais incorporam métodos tais como: Soxhlet, maceração e hidrodestilação. A maceração é a forma mais popular que existe de extrair óleos essenciais e compostos bioativos a partir de plantas. É utilizada, desde a antiguidade, na produção de tónicos caseiros (Jin Dai and Mumper 2010; Ibañez et al. 2012; Azmir et al. 2013). As extrações por hidrodestilação ou em Soxhlet são, ainda hoje, as técnicas de extração mais utilizadas.

A extração em Soxhlet tem sido amplamente utilizada para extrair compostos bioativos a partir de várias fontes naturais. Hoje em dia é usada como técnica de referência para comparação com as novas alternativas de extração. Geralmente, uma amostra seca ou fresca é colocada num cartucho e este é colocado no Soxhlet. O extrator é colocado no balão de destilação que contém o solvente de particular interesse. O processo é executado repetidamente até que a extração esteja completa (Azmir et al. 2013).

A hidrodestilação é um método tradicional para a obtenção do óleo essencial a partir de plantas. O facto de não envolver solventes orgânicos é uma grande vantagem. Este é efetuado recorrendo a água, água mais injeção de vapor e com vapor de forma direta (Azmir et al. 2013).

II.2 – Métodos não convencionais

Os métodos não convencionais, também conhecidos como ambientalmente mais amigáveis, recorrem às seguintes técnicas: extração com ultrassom, campo elétrico pulsado, digestão enzimática, micro-ondas, fluidos supercríticos (FSC) e extração acelerada por solventes. Estes métodos permitem a diminuição no uso de solventes orgânicos, redução do tempo operacional e um melhor rendimento e qualidade do extrato (Azmir et al. 2013).

Neste trabalho, o método não convencional utilizado foi a extração supercrítica (ESC) com CO₂. A extração de produtos naturais recorrendo a FSC tem despertado um elevado interesse em diversas áreas industriais, como a alimentar, a farmacêutica e a petroquímica,

pois tem demonstrado capacidade de cumprir exigências tanto a nível ambiental como a nível de especificações exigidas para os produtos de interesse (Azmir et al. 2013; Yener 2015).

A ESC é um processo que consiste na separação de substâncias solúveis de uma matriz sólida, por contacto com um solvente que se encontra a temperaturas e pressões acima do seu ponto crítico. Define-se como ponto crítico de uma substância pura, o valor de pressão e temperatura a partir do qual a substância deixa de existir em equilíbrio líquido-vapor. Acima deste ponto, a substância não apresenta diferença entre líquido e gás e, como tal, é denominado de fluido supercrítico (FSP) (Azmir et al. 2013; Yener 2015).

Os FSC apresentam propriedades termofísicas intermédias entre um gás e um líquido e estão sujeitos a sofrerem alterações das suas propriedades em caso de ligeiras variações de temperatura e pressão. Apresentam características que se assemelham a um gás, como a compressibilidade, difusividade elevada, e baixa viscosidade, mas também possuem propriedades similares a um líquido, tais como: densidade, tensão superficial baixa e elevado poder de solvatação, à semelhança dos solventes orgânicos. As propriedades referidas fazem com que os FSC sejam considerados solventes eficientes e seletivos, pois apresentam uma capacidade de dissolução equiparada a um solvente orgânico líquido, bem como as propriedades de transporte de um gás, que favorecem a extração dos compostos com tempos de retenção menores e com melhores rendimentos (Coelho et al. 2012; Azmir et al. 2013; Yener 2015).

São várias as substâncias utilizadas como FSC, nomeadamente etano, butano, propano, pentano, óxido nitroso, amoníaco, trifluorometano, água e dióxido de carbono. Destas substâncias, o CO₂ supercrítico destaca-se por ser o mais utilizado nos processos de ESC. O facto de o CO₂ supercrítico apresentar temperatura e pressão crítica ($T_c = 304,2 \text{ K}$ e $P_c = 7,4 \text{ MPa}$) baixas, permite a extração de compostos termolábeis com um menor risco de degradação. A preferência para o CO₂ supercrítico também está associada ao facto de este ser um fluido não inflamável, não tóxico, não corrosivo e disponível com elevada pureza e baixo custo. É um solvente não polar, o que o torna ideal para a extração de compostos lipofílicos e não polares, mas inadequado para compostos polares. Assim sendo, frequentemente são adicionadas pequenas quantidades de solventes auxiliares (tipicamente até 10%), de modo a modificar a polaridade do CO₂. Os solventes auxiliares mais utilizados são polares, tais como: metanol, etanol, acetato de etilo e acetona (Azmir et al. 2013; Yener 2015). Parâmetros como temperatura, pressão, tamanho de partícula, quantidade de amostra, caudal de solvente e duração de extração, também influenciam a eficiência da extração, por isso precisam de ser controlados (Coelho et al. 2012; Azmir et al. 2013; Yener 2015).

III – MÉTODOS DE ANÁLISE

III.1 – Atividade Antioxidante

Várias espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto podem provocar processos oxidativos em lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, promovendo a destruição da membrana, inativação de enzimas e de DNA. Estes danos podem estar na base de doenças, designadamente doenças degenerativas como Alzheimer e Parkinson, cancro, doenças cardiovasculares e envelhecimento nos seres humanos (Karimi and Jaafar 2011).

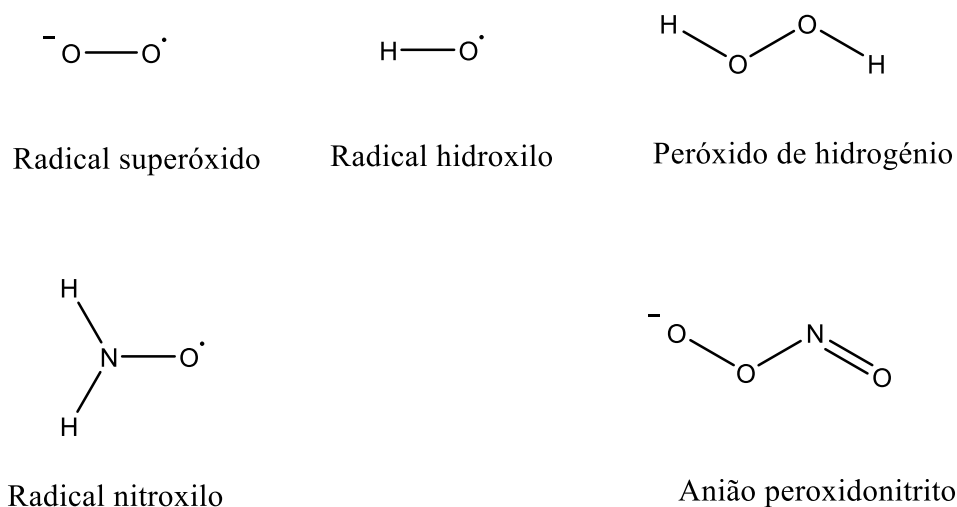


Figura 4- Exemplos de espécies reativas de oxigénio e azoto.

Os antioxidantes são compostos químicos extremamente úteis para os seres humanos, possuindo a capacidade de reduzir e/ou eliminar radicais livres, para diminuir a peroxidação lipídica no corpo humano, que originam as diferentes doenças. Em geral, existem duas categorias básicas de antioxidantes, os sintéticos e os naturais. Os antioxidantes primários mais conhecidos são os polifenóis, como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), (Li et al. 2012), que são sintéticos, e os tocoferóis, que são naturais. Estes últimos também podem ser classificados como antioxidantes biológicos.

As plantas são fontes naturais ricas em antioxidantes. Os compostos fitoquímicos (como os compostos fenólicos e flavonóides) encontrados nas plantas atuam, geralmente, como antioxidantes com propriedades redox e quelantes de metais. Além disso, outras atividades biológicas como anti-inflamatória, anti úlcera, antiviral, ações antialérgicas e vasodilatadoras também foram detetadas nestes compostos (Karimi and Jaafar 2011).

A utilização de BHA e BHT foi restringida por normas legislativas, devido ao aparecimento de efeitos adversos, relacionados com a toxicidade e efeitos cancerígenos dos mesmos (Li et al. 2012), existindo um interesse crescente na procura de antioxidantes de fontes naturais e mais seguros. Contudo, devido à matriz complexa da constituição das plantas, muitas vezes não é possível saber quais os compostos mais ativos, isto é, aqueles que apresentam melhor atividade, existindo uma enorme variedade de antioxidantes naturais presentes nas plantas, como polifenóis, alcaloides, vitaminas, etc (Djeridane et al. 2006). Por outro lado, a sinergia que muitas vezes existe entre os diferentes compostos que apresentam atividade antioxidante nas plantas é outro fator a considerar. Assim, a determinação da capacidade antioxidante de um composto isolado pode não refletir, exatamente, o seu potencial quando combinado com outro (J. Dai and Mumper 2010).

Nas classes de compostos referidos como fontes de antioxidantes naturais, os polifenóis destacam-se, pelo facto de serem os metabólitos secundários que ocorrem mais amplamente no reino vegetal, atuando como fitoalexinas, que contribuem para a pigmentação das plantas e a proteção contra a radiação solar. Os polifenóis incluem compostos tais como: ácidos fenólicos (benzoico e derivados de ácido cinâmico), antocianinas, flavonóides, taninos, lignina, lignanas, etc (Shi et al. 2005; J. Dai and Mumper 2010; Ajila et al. 2011). Existem evidências científicas relevantes de que os compostos fenólicos apresentam uma variedade de propriedades biológicas importantes, tais como antialérgicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, etc (Ajila et al. 2011).

A determinação da atividade antioxidante é efetuada recorrendo a vários métodos analíticos, de entre os quais se destacam os ensaios baseados na utilização dos radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) e 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), como métodos espectrofotométricos na determinação da capacidade antioxidante de alimentos, bebidas, extratos de plantas e compostos puros, devido aos procedimentos simples, rápidos, sensíveis e reprodutíveis envolvidos (Apak et al. 2013).

Tabela 3-Vários métodos analíticos de avaliação da capacidade antioxidante, adaptado de (Pisoschi and Negulescu 2011)

Ensaio de atividade antioxidante	Princípio dos métodos	Forma de determinação final
DPPH	Reação do antioxidante com um radical orgânico	Colorimetria
ABTS	Reação do antioxidante com um radical orgânico	Colorimetria
FRAP	Reação de um antioxidante com complexo de Fe(III)	Colorimetria
PFRAP	Redução do Ferricianeto de potássio pelo antioxidante seguida de reação de Ferricianeto de potássio com Fe^{3+}	Colorimetria
ORAC	Reação do antioxidante com o radical peróxido, induzido por AAPH	Perda de fluorescência
TRAP	Capacidade antioxidante para eliminar os radicais derivados do luminol, gerados a partir da decomposição de AAPH	Extinção da quimiluminescência

Os métodos de DPPH e ABTS são determinados espectrofotometricamente de modo muito semelhante. Baseiam-se na capacidade de doação de elétrons ou hidrogénios de uma amostra com potencial antioxidante, na presença de radical livre estável de DPPH \cdot e/ou radical catião ABTS \cdot^+ .

O efeito dos antioxidantes sobre a solução de DPPH \cdot permite a sua neutralização para DPPH-H, ocorrendo uma descoloração da solução inicial de DPPH (violeta) para amarelo. A descoloração traduz-se num decréscimo da absorvância ao longo do tempo; normalmente os ensaios são realizados com tempo de espera de 30 minutos, determinado por

espectrofotometria a 517 nm. Quanto mais rapidamente se verificar a descoloração da solução, maior é a concentração de substâncias com capacidade antioxidante e, conseqüentemente, maior será a atividade antioxidante (Apak et al. 2013).

Uma das formas de representar a atividade antioxidante determinada pelo método de DPPH é a determinação do IC50. Ou seja, é a determinação da concentração de antioxidante necessário para inibir, em 50 %, os radicais livres de DPPH em solução. A percentagem de inibição é calculada através da seguinte expressão:

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{A_{\text{Controlo}} - A_{\text{Amostra}}}{A_{\text{Controlo}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde, A_{Controlo} é a absorvância do DPPH[•] no solvente e A_{Amostra} é a absorvância de DPPH[•] na amostra com capacidade antioxidante. Um menor valor de IC50 significa uma melhor capacidade antioxidante (Apak et al. 2013).

Para o ABTS, o efeito dos antioxidantes sobre o ABTS^{•+} é controlado através da diminuição da absorvância a 415 ou 734 nm, na presença do composto testado. O ABTS^{•+} é previamente formado através da oxidação de ABTS, induzida por radicais ROO[•] ou outros oxidantes. A representação da atividade antioxidante é efetuada em termos de IC50. A percentagem de inibição é calculada pela Equação 1 (Jaszek et al. 2013).

Outros métodos utilizados neste trabalho para avaliar a capacidade antioxidante são: determinação de fenóis totais pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, determinação de teor em flavonóides pelo método de cloreto de alumínio e poder de redução do Fe³⁺ para Fe²⁺.

A capacidade redutora dos compostos vegetais está diretamente relacionada com a sua capacidade antioxidante. O poder de redução é um método que se baseia na capacidade que os antioxidantes possuem de reduzir o Fe³⁺ a Fe²⁺, numa reação redox, que envolve a transferência de um elétron (Hung et al. 2002). Dependendo do poder redutor dos compostos avaliados, a cor da solução altera para várias tonalidades de verde ou azul, podendo ser medida espectrofotometricamente a 700 nm (Yen, Chen, and Science 1995).

Quando a espécie oxidante é o Fe³⁺ ou o Fe(CN)₆³⁻ (na composição do reagente ferrocianeto de potássio), forma-se, respetivamente, Fe²⁺ ou Fe(CN)₆⁴⁻ como produto da redução com o antioxidante, combinando-se com o outro componente do reagente para originar KFe[Fe(CN)₆] (azul da Prússia) como produto. Neste método, o aumento da absorvância indica o aumento da atividade antioxidante, ou seja, quanto mais azul estiver a mistura, maior o poder redutor do extrato. O ensaio do poder redutor é considerado simples, rápido,

económico e bastante fiável, podendo ser aplicado de forma manual, automatizada ou semi-automatizada (Prior, Wu, and Schaich 2005). Neste trabalho utilizou-se o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) como controlo positivo.

O ensaio de Folin-Ciocalteu, também conhecido como método de determinação de fenóis totais, é usado frequentemente na determinação do teor de compostos fenólicos numa determinada amostra. É um ensaio de fácil aplicação, sensível e reprodutível. É amplamente utilizado na determinação de compostos fenólicos de extratos e óleos essenciais provenientes de fontes naturais (Singleton, Rossi, and JR. 1965).

O princípio desta técnica tem como base uma reação de oxidação-redução, em meio alcalino, entre o reagente folin de coloração amarela (mistura de ácidos fosfomolibdúico e fosfotúngstico) e os polifenóis. O reagente folin é reduzido e os polifenóis presentes na amostra são oxidados, resultando na formação de um complexo de cor azul de fosfotúngstenio e fosfomolibdénio, $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}]$. A intensidade da cor é proporcional à concentração de polifenóis presentes na amostra. A sua determinação é efetuada por espectrofotometria a 765 nm, absorção máxima, e expressa em miligrama de equivalentes em ácido gálico (EAG) por grama de extrato (Singleton, Rossi, and JR. 1965).

A determinação dos flavonóides totais, usando o método de cloreto de alumínio, é baseada na formação de um complexo estável entre cloreto de alumínio, o grupo ceto e grupos hidroxilo dos flavonóides presentes na amostra (Hassan, Aqil, and Ttimarad 2013).

III.2 – Atividade Antimicrobiana e Toxicidade Geral

A grande variedade de compostos bioativos presentes nas plantas tem representado uma alternativa promissora e sustentável para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, com potencialidade antimicrobiana, que apresentam menores efeitos adversos e uma menor probabilidade de as espécies apresentarem resistência. (A.K Pandey and Kumar 2013). Assim, extratos ou compostos isolados de plantas têm sido objeto de estudo, com vista à descoberta de novos agentes antimicrobianos, para o combate de infeções bacterianas e fúngicas. (Pereira et al. 2015).

Muitos dos fármacos utilizados na medicina, hoje em dia, são provenientes de fontes naturais e/ou de semi-síntese a partir de compostos naturais. Aproximadamente 20% de plantas no mundo já foram sujeitas a testes farmacêuticos e biológicos, sendo que grande parte dos antibióticos introduzidos no mercado é obtida a partir da fonte natural ou recursos

semissintéticos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais são as melhores fontes para a obtenção de fármacos (Hemalatha et al. 2013).

Existem vários métodos laboratoriais que podem ser utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos ou de compostos puros. O mais conhecido e mais utilizado dos métodos é o de difusão agar (técnica do disco e poços) e microdiluição em caldo. Para um estudo mais aprofundado da atividade microbiana, recomendam-se testes como *time-kill*, podendo assim tirar-se conclusões acerca do efeito inibitório que apresenta a nível bacteriostático ou bactericida (Balouiri, Sadiki, and Ibsouda 2016).

O método de difusão em agar foi desenvolvido em 1940, é oficialmente utilizado em muitos laboratórios de microbiologia para testes de suscetibilidade antimicrobiana. (Balouiri, Sadiki, and Ibsouda 2016).

Este método permite testar, *in vitro*, organismos patogénicos comuns, sendo reprodutível e facilmente empregue. É meramente qualitativo, isto é, baseia-se na presença e/ou ausência de uma zona de inibição do crescimento do microrganismo (Bonev and Hooper 2008).

O método apresenta vantagens, como a facilidade de execução, a facilidade de interpretação dos dados e o baixo custo associado. Contudo, nem sempre é indicada a sua utilização na determinação da atividade antimicrobiana de produtos naturais, como os extratos de plantas, pois estes são matrizes complexas, onde os compostos presentes podem ter polaridades diferentes, afetando, deste modo, a difusão dos mesmos. Os compostos com menor polaridade podem difundir-se mais lentamente do que os mais polares no agar. (Bonev and Hooper 2008).

A determinação precisa da sensibilidade bacteriana dos antibióticos, é essencial para a gestão bem-sucedida de infeções bacterianas, pois permite fazer uma análise comparativa dos agentes antimicrobianos. Isto pode ser feito usando técnicas como a microdiluição em caldo, que permitem fazer análises quantitativas. A eficácia dos antibióticos pode ser avaliada pela sua capacidade de suprimir o crescimento bacteriano, descrita pela CMI (concentração mínima inibitória) ou pela sua capacidade para matar as bactérias, caracterizada pela concentração letal mínima (CML) (Bonev and Hooper 2008).

III.3 – Inibição Enzimática

As enzimas são proteínas com funções catalíticas, isto é, aumentam a velocidade com que se atinge o estado de equilíbrio da reação, não afetando, contudo, esse estado. São macromoléculas proteicas, altamente especializadas, que possuem as seguintes propriedades: eficiência catalítica, alto grau de especificidade relativamente ao substrato e possibilidade de serem reguladas (Quintas, Freire, and Halpern 2008; Voet and Voet 1995).

Como catalisadores, as enzimas são eficazes em quantidades mínimas (em relação às concentrações dos reagentes) e permanecem inalteradas após a libertação dos produtos. As reações catalisadas por enzimas ocorrem a velocidades 10^4 e 10^{17} , superiores às correspondentes reações na ausência da enzima. As enzimas apresentam uma especificidade face aos reagentes (designados por substratos), que pode ser para um único substrato ou para um grupo de substratos com estruturas semelhantes (Quintas, Freire, and Halpern 2008).

Muitas enzimas retêm o seu potencial catalítico após extração do organismo vivo; assim sendo, não demorou muito para a comunidade científica reconhecer este facto e explorar o poder catalítico das enzimas para fins comerciais. As primeiras referências que se têm da utilização de enzimas como catalisador são dos que descrevem a produção de pão, queijo, e bebidas alcoólicas, sendo atualmente fundamentais e utilizadas em muitos processos industriais (Copeland 2000; Quintas, Freire, and Halpern 2008).

A atividade enzimática pode ser medida, determinando a velocidade da conversão do substrato, quer pela diminuição deste, quer pelo aumento da concentração do produto da reação. Estes ensaios devem ser realizados em condições ótimas de temperatura e pH (Quintas, Freire, and Halpern 2008; Voet and Voet 1995).

As enzimas são de interesse fundamental nas ciências da saúde, uma vez que muitos processos de doenças podem ser interligados às atividades anormais de uma ou de algumas enzimas. Assim, grande parte da pesquisa farmacêutica moderna é baseada na procura de inibidores potentes e específicos de uma determinada enzima (Copeland 2000).

Os inibidores são compostos que diminuem a velocidade de uma reação enzimática. São importantes em enzimologia, já que muitos efeitos fisiológicos (tóxicos e funcionais) são resultantes da inibição da atividade enzimática; por outro lado, a utilização de inibidores *in vitro* tem contribuído para o esclarecimento de mecanismo de reações envolvendo enzimas (Quintas, Freire, and Halpern 2008; Voet and Voet 1995).

A inibição pode não resultar numa interação direta entre as moléculas de inibidor e enzima, podendo, por exemplo, observar-se uma diminuição de atividade se uma molécula se ligar ao substrato, modificando-o de tal modo que este deixe de ser reagente no processo. No entanto, quando se fala de inibição enzimática, em geral, refere-se a interação inibidor-enzima (Voet and Voet 1995).

Um grande número de fármacos, comumente utilizados, é inibidor de enzimas; estes incluem medicamentos para tratar VIH, cancro, demências e doenças cardíacas. Existem vários mecanismos diferentes de inibição da enzima, todos têm a sua própria característica e efeito sobre a cinética da enzima (Voet and Voet 1995).

A procura de inibidores enzimáticos a partir de fontes naturais tem aumentado a cada dia. Doenças como Alzheimer (DA), onde o número de fármacos disponível para o tratamento é reduzido, despertaram a comunidade científica na procura de inibidores enzimáticos específicos e potentes (Ferreira et al. 2006; Mukherjee et al. 2007; Chang 2009; Krsti et al. 2013).

Neste trabalho, testou-se a capacidade inibitória de extratos de manjerição e da palmeira anã em duas enzimas: acetilcolinesterase (AChE) e a tirosinase (TyrE).

III.3.1 – Acetilcolinesterase (AChE)

Colinesterase é uma família de enzimas que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético, uma reacção necessária para permitir que um neurónio colinérgico volte ao seu estado de repouso após ativação (Colovic et al. 2013).

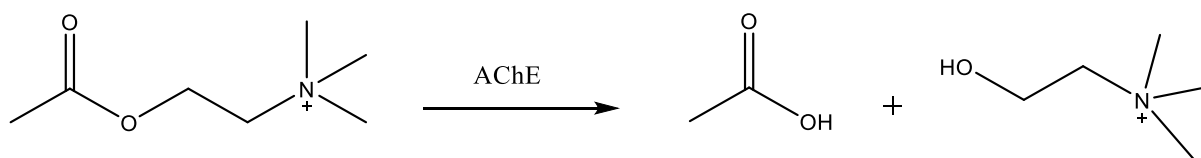
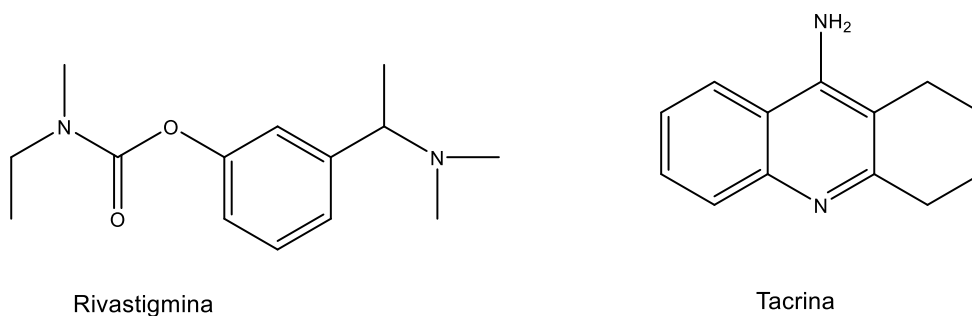


Figura 5- Esquema da catálise da acetilcolina

O papel principal da acetilcolinesterase (AChE) é a terminação da transmissão do impulso nervoso nas sinapses colinérgicas por hidrólise rápida da acetilcolina (ACh). A inibição da AChE serve como uma estratégia para o tratamento da doença de Alzheimer (DA), demência e doença de Parkinson (Mukherjee et al. 2007).

Existem alguns medicamentos sintéticos como, por exemplo: Tacrina, Donepezilo, e produtos naturais como Rivastigmina para o tratamento de disfunção cognitiva e perda de memória associada à DA. O primeiro inibidor de AChE aprovado especificamente para o tratamento de DA foi introduzido em 1993, como 1, 2, 3, 4-tetra-hidro-9-aminoacridina (Tacrina). O rastreio da atividade inibidora da AChE, a partir de recursos naturais, tem sido relatado baseado em reações de Ellman (Mukherjee et al. 2007).



Rivastigmina

Tacrina

Figura 6- Exemplo de fármacos utilizados como inibidores de enzimas.

Na medicina tradicional Coreana, foi relatada uma variedade de plantas para mostrar a atividade inibitória da AChE. Em extratos metanólicos de sete plantas — *Acorus calamus*, *Acorus gramineus*, *Bupleurm facaltum*, *Dioscorea batatas*, *Epimedium koreanum*, *Poria cocos* e *Zizyphi jujuba* — foi testada a capacidade de inibição do AChE, apresentando inibição significativa para a *Acorus calamus* e *Epimedium koreanum* (Mukherjee et al. 2007).

III.3.2 – Tirosinase (TyrE)

Nas últimas décadas, os inibidores da tirosinase têm sido alvo de uma grande preocupação devido ao papel fundamental da tirosinase, na melanogênese em mamíferos, frutas e fungos (T. Chang 2009; Vardhan, Khan, and Pandey 2014).

A melanogênese é definida como todo o processo que conduz à formação de pigmentos escuros macromoleculares, isto é, a melanina (T. Chang 2009). A produção de melanina é o principal responsável para a cor da pele, olhos, cabelo e desempenha um importante papel defensivo contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta da luz solar. No entanto, a superprodução e acumulação de melanina no organismo pode provocar várias doenças dermatológicas, incluindo melasma, sardas, manchas de idade, ou outras hiperpigmentações. A melanina é produzida normalmente pelos melanócitos e, em maior extensão, por células de melanoma. Nos mamíferos, a melanina é sintetizada nos

melanossomas de melanócitos que contêm tirosinase, que desempenha um papel fundamental na melanogénese, catalisando duas etapas limitantes da velocidade da melanogénese: a hidroxilação de L-tirosina para de L-DOPA e a subsequente oxidação da L-DOPA a dopaquinona (Yy et al. 2011; Vardhan, Khan, and Pandey 2014).

Por estas razões, a tirosinase é um alvo atrativo na procura de vários agentes de descoloração. Os agentes, tais como a hidroquinona e o ácido kógico que inibem a atividade da tirosinase, têm o potencial de serem agentes anti-melanogénese, promovendo a despigmentação. Esses inibidores são muito importantes em aplicações cosméticas, pois permitem produzir efeitos de branqueamento e de correção na pele. Vários estudos têm indicado que muitos extratos de plantas mostram a atividade inibidora contra a tirosinase *in vitro.* (Yy et al. 2011; Vardhan, Khan, and Pandey 2014).

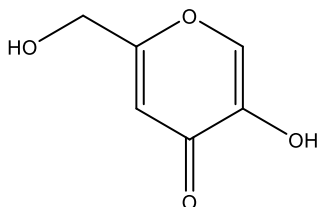


Figura 7- Ácido kógico, inibidor da tirosinase.

O ácido kógico (5-hidroxi-2-(metilhidroxi)-4H-piran-4-ona) é o inibidor da tirosinase mais estudado, por isso é diversas vezes usado como controlo positivo de experiências que procuram novos inibidores para a tirosinase. Este composto é um produto metabólico secundário produzido pelas espécies fúngicas *Aspergillus* e *Penicillium*. Dada a sua capacidade em inibir a tirosinase, tem sido amplamente usado na indústria da cosmética, como agente branqueador e corretor de manchas ou sardas e na indústria alimentar, como aditivo para prevenir o processo de oxidação de alimentos (T. Chang 2009; T.-M. Chang 2012; C. Chang et al. 2013).

III.4 – Análise por GC-MS e HPLC-MS

A análise dos extratos (palmeira anã e manjeriço) e de óleos essenciais de manjeriço foi efetuada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia líquida de alta performance com espectrometria de massa (HPLC-MS) e com detetor de foto díodos (DAD).

Em sistemas de HPLC-MS e GC-MS (Figura 8), os compostos são separados nas colunas cromatográficas e enviados para espectrómetros de massa. Cada composto eluído é ionizado a espécie iónica em fase gasosa, na fonte de ionização. O excesso de energia transferida durante a ionização provoca fragmentação dessas espécies iónicas para produtos de iões. Todos os iões são em seguida separados, de acordo com a razão massa-carga (m/z), valores do analisador de massas. O tipo de analisador de massa vai decidir a qualidade dos dados experimentais obtidos, em relação à precisão e resolução de massa e à sensibilidade. Finalmente, a corrente de iões é medida e amplificada em detetores multiplicadores de eletrões ou da matriz. A quantidade de corrente elétrica gerada dependerá da abundância de iões a colidir no detetor (Kicman, Parkin, and Iles 2007).

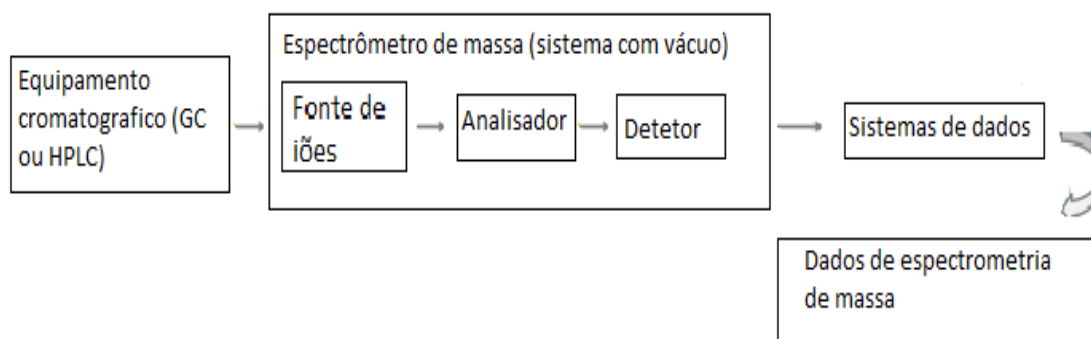


Figura 8- Sistema geral de GC-MS e HPLC-MS Adaptado de Kicman, Parkin, and Iles (2007).

IV – PARTE EXPERIMENTAL

IV.1 – Recolha, processamento e armazenamento das amostras vegetais da Palmeira Anã - *Chamaerops humilis* L e Manjerição – *Ocimum basilicum*.

A recolha das amostras (folhas) da Palmeira Anã foi efetuada em Outubro de 2014, pelo professor Amadeu Brigas, no Algarve. As folhas recolhidas foram limpas, secas à temperatura ambiente durante uma semana e reduzidas a pequenos pedaços com o auxílio de uma tesoura. A sua trituração utilizando um moinho de lâminas não se mostrou eficaz devido ao seu caráter fibroso, inviabilizando desta forma a diminuição do tamanho de partícula suficiente, para permitir posteriormente estudos de extração com fluidos supercríticos. A planta foi armazenada em recipientes fechados a uma temperatura entre 4 a 6°C.

O manjerição foi fornecido pela empresa Aromáticas Vivas, LDA, Origem: Portugal HF 126062, Lote 11-01, Embalado:14/03/2016. Uma parte das folhas foi seca numa estufa durante 72 horas a 40°C, com ventilação a 70% (LSIS-B2V / VC111 1900 W). Procedeu-se à sua trituração com um moinho de lâminas (IKA WERKE-M20), suavemente e, posteriormente, foram armazenadas em recipientes fechados a uma temperatura de -20°C.

Esta diferente forma de procedimento deveu-se às potenciais diferenças dos compostos que existiam nas plantas, nomeadamente em termos de volatilidade, degradação com a luminosidade e degradação com a temperatura no seu armazenamento.

IV.2 – Obtenção dos extratos da Palmeira Anã e Manjerição

IV.2.1 – Extração em Soxhlet

A obtenção do extrato da Palmeira Anã em *Soxhlet*, foi efetuada durante 6 horas, utilizando metanol (*Sigma Aldrich* 99,8 % - retificado) e hexano (*Analar Normapur* 99,3 % - retificado) como solventes. A purificação e rectificação dos solventes foram efetuadas em diferentes sistemas de destilação existentes no Laboratório de Orgânica e Inorgânica do ISEL.

Para a extração das folhas de manjerição (frescas e secas) usou-se metanol (*Sigma Aldrich* 99,8 % - retificado) e etanol absoluto (Panreac 99,5 %).

Os extratos obtidos das duas plantas, foram filtrados num sistema de filtração a vácuo, usando um filtro da *Mfd. for Waters Corporation* $0.45 \mu\text{m}$ de diâmetro. Por fim secaram-se os extratos num rota-vapor e numa linha de vácuo de modo a garantir a evaporação do solvente. Os extratos obtidos foram armazenados no frigorífico a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, até à sua utilização.

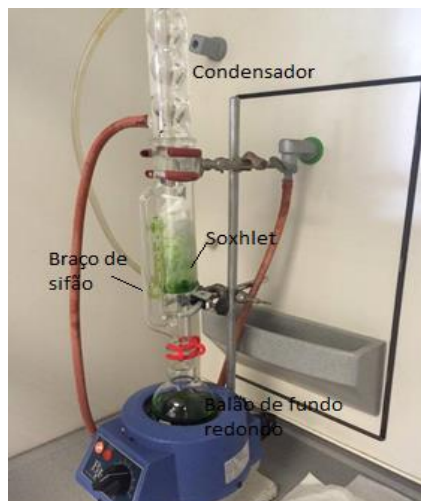


Figura 9- Esquema de extração em Soxhlet

IV.2.2 – Hidrodestilação

Os óleos essenciais do manjeriço foram obtidos através da hidrodestilação num *Clevenger*, utilizando folhas frescas e secas. Para as folhas frescas usou-se uma carga de 207,215 g de planta em 500 mL de água destilada, tendo o processo decorrido durante 3 horas. A determinação do rendimento foi efetuada tendo em conta a percentagem de humidade da planta, determinada previamente. Assim o resultado do rendimento é apresentado em base seca. Para as folhas secas procedeu-se do mesmo modo, utilizando 21,3662 g de folhas.



Figura 10- Esquema de hidrodestilação com um *Clevenger*.

IV.2.3 – Extração supercrítica

Um dos equipamentos utilizados para a extração supercrítica foi o da *Applied Separation Spe-ed SFE*, existente no CIEQB-ISEL, que permite realizar ensaios para temperaturas até aos 120°C e pressões de 600 bar.

O forno do extrator tem capacidade para dois vasos extratores (células de extração) em linhas separadas, que, por sua vez, apresentam controladores de caudal independentes para cada uma das linhas, as válvulas micrométricas. Os vasos possuem dois filtros em aço (*frit's* de metal de 5 µm) em cada extremidade, para que não ocorra arrastamento da matriz que não se encontra dissolvida no solvente.

Na Figura 10 apresenta-se o esquema do equipamento de extração supercrítica.

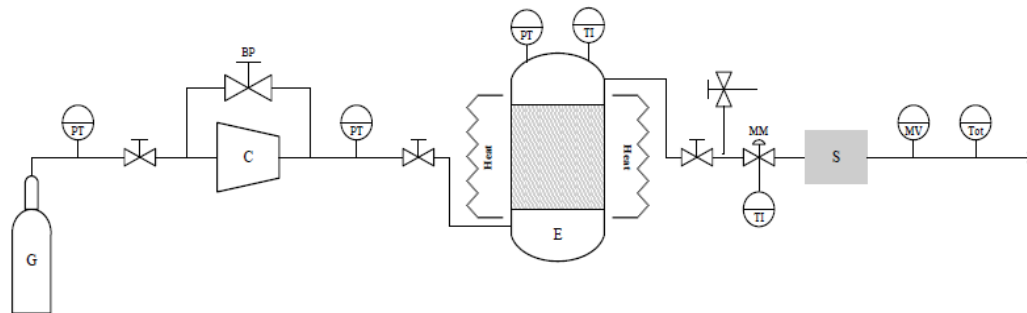


Figura 11- Esquema representativo do equipamento de extração supercrítica

(Legenda: C – compressor; E – extrator; S – separador; BP – regulador de pressão (“*Back-Pressure*”); MM – válvula micrométrica; MV – caudalímetro; Tot – totalizador; TI – indicador de temperatura; PT – manómetro) (Marques & Coelho, 2011).

O equipamento e os compressores foram ligados previamente, bem como impostas as condições de temperatura pretendidas.

Esperou-se até à estabilização da temperatura pretendida e, depois de garantido que o sistema estava termicamente estável, impôs-se a pressão de trabalho na célula e deixou-se estabilizar, cerca de 20 minutos, para uniformização das condições impostas.

O funcionamento do sistema descreve-se em três fases:

- Compressão do gás – Compressão inicial do fluido por meio de um compressor auxiliar da Jun-Air, modelo OF302, que eleva a pressão do gás até 7 bar para ativação do compressor (C) da Applied Separations, modelo Spe-ed SFE, (que só

efetua compressões de gases acima dos 7 bar). Este último comprime o gás até à pressão desejada de funcionamento do extrator (E).

- Aquecimento – Após a compressão do gás até à pressão desejada, este segue para o extrator (E) da Applied Separation Spe-ed SFE, modelo Spe-ed SFE-2, onde será aquecido até à temperatura pretendida. A amostra a estudar é previamente introduzida na célula E, que posteriormente é colocada no interior do forno.
- Extração – Depois de o gás atingir as condições críticas de temperatura e pressão, este percorre a célula que contém a amostra e solubiliza-a, sendo a mesma posteriormente recolhida pela válvula micrométrica (MM). O separador (S) é um filtro da Applied Separations, modelo Spe-ed SFE phase extraction, que permite, à saída, a recolha da amostra precipitada, enquanto o gás é enviado para o caudalímetro e medidor de gás total. O caudal e o volume total de CO₂ são medidos num equipamento da Alicat Scientific, modelo M-5SLPM-D, que tem a função de caudalímetro (MV) e possibilita a medição do caudal instantâneo e do volume total de gás gasto a ± 5 mL.

O vaso extrator foi preenchido previamente com lã de propileno em cada extremidade e amostra da matriz triturada no centro (cerca de 13 g). Após o seu enchimento, este foi montado no interior do forno e, de forma a facilitar a sua instalação, foi fixada inicialmente a parte inferior e só depois a parte superior.

As extrações supercríticas foram realizadas em dois equipamentos, utilizando exclusivamente a planta seca. No equipamento da figura 11, existente no ISEL, foram extraídas duas amostras de manjeriço, para comparação com os extratos obtidos em Soxhlet. Em ambas, o extrator (E), foi enchido com planta após a sua secagem (como descrito em IV.1), uma vez que a utilização da mesma fresca não é viável, sendo mesmo uma limitação para a ESC. Como efeito, a água existente na planta fresca iria competir com o extrato a obter com o CO₂ supercrítico, sendo extraída preferencialmente, e obrigando a uma elevada quantidade de solvente (CO₂), o que tornaria não rentável a técnica a utilizar. Por outro lado, considerando que o equipamento da figura 11 não permite o fracionamento dos extratos obtidos, teríamos no final um extrato com uma elevada quantidade de água, o que tornaria difícil a sua secagem e a quantificação real da massa obtida na extração. O rendimento da extração em função da massa de CO₂ utilizado encontra-se no Anexo I.

A primeira amostra de planta seca, sem qualquer pré-extração, foi submetida às condições de trabalho para uma temperatura de 333,15 K e a uma pressão de 400 bar (40 MPa), com CO₂ puro 99,995% fornecido pela Gasin (Matosinhos, Portugal). O caudal instantâneo de

CO₂, no decorrer das extrações, foi de 1.0 dm³/min. As condições de pressão, temperatura e caudal foram escolhidas considerando a experiência anterior de utilização do equipamento e, nomeadamente, o extrato a obter com quantidade de antioxidantes, para serem comparados com as técnicas convencionais (Coelho and Palavra 2015).

Os extratos foram recolhidos num tubo em U, à pressão atmosférica e a uma temperatura controlada por meio de um banho de gelo.

A válvula micrométrica (MM, figura 10) foi lavada com um solvente apropriado para recolher quaisquer resíduos de extrato, tendo sido posteriormente filtrado das soluções e evaporados do solvente a vácuo, num aparelho de rota-vapor, a 40°C, até à secura e, em seguida, foram secos sob azoto. Toda a quantidade de extrato recolhida foi junta ao já recolhido e quantificada gravimetricamente com uma incerteza de ± 0.1 mg.

Uma segunda amostra de planta seca foi igualmente submetida à extração supercrítica nas mesmas condições e seguindo os procedimentos descritos no parágrafo anterior. Contudo, esta amostra foi previamente extraída com CO₂ supercrítico a 90 bar e 40°C para um caudal 8,36 L/min, num equipamento existente no IST-UL, previamente testado e desenvolvido (Coelho et al. 2003, 2007). Este equipamento apresenta a particularidade de possuir dois separadores com pressões e temperaturas controladas, permitindo o fracionamento do extrato obtido.

Assim, num primeiro separador, a pressão e a temperatura foram reduzidas para os valores de 75 bar e -14°C, com o objetivo de se separar e precipitar as ceras que foram extraídas (a 90 bar e 40°C); num segundo separador, a pressão e a temperatura foram reduzidas para 1 bar e 0°C, obtendo-se um óleo volátil.

Este óleo volátil obtido por ESC, com fracionamento, é comparado ao óleo essencial, em termos de identificação de GC-MS e de quantificação por GC-Fid. Por outro lado, os dois extratos obtidos por ESC são comparados com os extratos obtidos por Soxhlet, com os diferentes solventes, sendo que nestes casos a matriz inicial da planta é sempre seca.

IV.3 – Avaliação da atividade antioxidante dos extratos da Palmeira Anã e do Manjeriço

A atividade antioxidante dos extratos da Palmeira Anã e do Manjeriço foi avaliada recorrendo a três métodos: radical livre DPPH[•], radical catião ABTS^{•+} e o poder de redução do ião Fe³⁺. Efetuaram-se ainda mais dois ensaios complementares, a determinação dos fenóis totais e do teor em flavonóides.

IV.3.1 – Determinação do teor total em polifenóis - Convencional

Para a determinação do teor total de polifenóis, pelo método de *Folin-Cicalteau* descrito por (Dorman et al. 2003; Mechergui et al. 2010), é necessário traçar uma curva de calibração, utilizando soluções padrão de ácido gálico (Sigma Aldrich, 98 %) em metanol. Para o efeito, preparou-se inicialmente uma solução de ácido gálico 5 g/L.

A partir da solução inicial de ácido gálico, por diluições sucessivas, preparam-se 12 soluções com as seguintes concentrações, 12.5, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700 mg/L. De acordo com método de *Folin-Cicalteau*, procedeu-se da seguinte forma:

1. Em 12 tubos de ensaio preparam-se as amostras utilizando 50 μ L das soluções de ácido gálico, com as concentrações referidas anteriormente, 250 μ L de reagente Folin (Sigma Aldrich 2N) e 3.95 ml de H₂O destilada.
2. Ao fim 4 minutos de reação entre a solução de ácido gálico, as diferentes concentrações e o reagente Folin, adicionaram-se 750 μ L de solução de carbonato de sódio (0.25 mg/L). A mistura foi agitada num vortex (Labnet VX100) e colocada num banho de água a 40°C, durante 30 minutos.
3. Num espectrofotómetro de UV/Vis (Thermo Electron Corporation Evolution 300) leu-se a absorvância das soluções a 765 nm contra um branco constituído por 50 μ L de metanol, 3.95 ml de H₂O, 250 μ L de reagente Folin e 750 μ L de solução de carbonato de sódio (0.25 mg/L). As leituras foram efetuadas em triplicado.
4. Com os dados obtidos da leitura de absorvância traçou-se a curva de calibração, absorvância em função da concentração de ácido gálico.

Para a análise, foram dissolvidas diferentes quantidades de extratos em 1 mL de metanol. De seguida, procedeu-se da mesma forma que o anteriormente descrito para a construção da curva de calibração, substituindo os 50 μ L das soluções de ácido gálico por 50 μ L de solução de extrato. Os restantes passos foram efetuados na mesma sequência.

Os testes foram efetuados em triplicado e a quantidade de polifenóis foi expressa em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato, segundo (Dorman et al. 2003; Mechergui et al. 2010).

IV.3.2 – Determinação do teor total em polifenóis - Microplaca

A determinação do teor de polifenóis através do método de Folin-Cicalteau em microplaca foi efetuada de acordo como descrito por Bobo-García et al. (2015).

Utilizando a mesma técnica descrita, recorreu-se a um leitor de microplaca (BIO-RAD Model 680 Microplate Reader), de modo a traçar-se uma curva de calibração para a determinação de polifenóis em microplacas de 96 poços. Para tal, a partir de uma solução mãe de ácido gálico (0.25 mg/L), pipetou-se 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280 e 300 μL e adicionou-se metanol, de modo a perfazer um volume total de 300 μL , sendo estes os padrões.

1. A partir de cada uma das soluções padrão, preparadas de acordo com o em cima descrito, retiraram-se 30 μL e adicionou-se nos poços.
2. Em seguida, adicionaram-se 150 μL de reagente Folin (2N) 1:10 (V/V) em H_2O destilada.
3. Ao fim 4 minutos de reação entre os padrões de ácido gálico e o reagente *Folin (2N)*, adicionou-se 120 μL de solução de carbonato de sódio (0.25 mg/L). A mistura foi colocada numa estufa a 40°C, durante 30 minutos.
4. A leitura foi efetuada a 655 nm, em triplicado, contra um branco constituído por 30 μL de metanol mais os restantes reagentes, recorrendo a um leitor de microplaca (BIO-RAD Model 680 Microplate Reader).

Com os dados obtidos da leitura, traçou-se a curva de calibração para a determinação de polifenóis nos extratos.

Para a análise, os extratos foram dissolvidos em 1 mL de metanol. De seguida procedeu-se da mesma forma que o anteriormente descrito para a construção da curva de calibração, substituindo os 30 μL das soluções de ácido gálico (Sigma Aldrich, 98 %) por 30 μL de solução de extrato. Os restantes passos foram efetuados na mesma sequência.

Os testes foram efetuados em, pelo menos, triplicado e a quantidade de polifenóis foi expressa em mg equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato, segundo Bobo-García et al. (2015).

A utilização destas duas técnicas permitiu-nos verificar a viabilidade da utilização das microplacas, não só pelos resultados mais coerentes obtidos, mas também pela capacidade de se poder efetuar de uma forma mais fácil e rápida, para além de permitir que os ensaios

possam ser realizados em triplicado ou, em alguns casos, em quintuplicado, com uma utilização de menor quantidade de reagentes.

IV.3.3 – Determinação do teor total em flavonóides

A determinação do teor de flavonóides foi efetuada pelo método de cloreto de alumínio, descrito por Reis et al. (2011), Rajasekaran and Kalaimagal (2011). Para tal, é necessário traçar-se uma curva de calibração, utilizando soluções padrão de catequina (Sigma Aldrich 98%).

Preparou-se uma solução mãe de catequina (Sigma Aldrich 98%) 0.5 mg/mL em 50% de etanol. A partir desta solução, por diluições sucessivas, prepararam-se os padrões com as seguintes concentrações: 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 e 200 µg/mL. A determinação pelo método de cloreto de alumínio foi feita da seguinte forma:

1. Adicionaram-se, em microplacas (NUNC), 25 µL dos padrões de catequina (Sigma Aldrich 98%) com diferentes concentrações e 100 µL de H₂O destilada.
2. Em seguida, adicionou-se 7.5 µL de NaNO₂ 5% (W/V (Panreac 98%).
3. Deixou-se repousar durante 5 minutos, à temperatura ambiente e adicionaram-se 7.5 µL de AlCl₃ (Merck 98%) em 10% etanol .
4. Deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 5 minutos, adicionaram-se 100 µL de NaOH (Merck Pró-Análise) e incubou-se, durante 10 minutos, à temperatura ambiente.
5. Ao fim dos 10 minutos, leu-se a absorvância, contra um branco constituído por 25 µL de etanol: água (50:50) e os restantes reagentes, num leitor de microplaca (FLUOstar OPTIMA) a 510 nm.

Com os dados obtidos da leitura, traçou-se a curva de calibração para a determinação do teor de flavonóides nos extratos, absorvância em função da concentração.

O extrato foi dissolvido em 1 mL de metanol. A sua análise foi efetuada seguindo os mesmos passos acima referidos para a construção da curva de calibração, substituindo os 25 µL dos padrões de catequina por 25 µL de solução de extrato com diferentes concentrações. Os testes foram efetuados em triplicado e a quantidade de flavonóides foi expressa em micromole, equivalente de catequina (EC) por grama de extrato, segundo Reis et al. (2011).

IV.3.4 – Método de radical livre *DPPH*

A determinação da atividade antioxidante foi efetuada pelo método de microplaca, de acordo com o descrito por Bobo-García et al. (2015), com algumas alterações.

Preparou-se uma solução de DPPH (Sigma Aldrich) 100 µM em metanol (Sigma Aldrich 99.8% - retificado).

1. Numa microplaca (Nunc), pipetou-se para os poços 30 µL de soluções de extratos com diferentes concentrações.
2. Em seguida adicionaram-se 270 µL da solução de DPPH 100 µM. Utilizou-se como branco e controlo da mistura reacional, 300 µL de metanol e uma mistura de 30 µL de metanol mais 270 µL da solução de DPPH 100 µM respetivamente.

A mistura reacional foi incubada durante 40 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. Depois dos 40 minutos leu-se a absorvância a 510 nm num leitor de microplaca (FLUOstar OPTIMA). As leituras foram efectuadas, pelo menos, em triplicado e a atividade antioxidante de cada amostra foi determinada em termos de IC50, percentagem de inibição que corresponde a inibição de 50% do radical livre de DPPH presente na solução, expresso em mg/mL da solução.

De modo a avaliar a sensibilidade do método utilizado, utilizou-se o ácido ascórbico (*Panreac* 99%), e Trolox (Sigma Aldrich 98% - ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) como antioxidantes de referência. A determinação do IC50 dos antioxidantes de referência foi efetuada de igual modo ao do extrato.

IV.3.5 – Método radical catião *ABTS*^{·+}

A determinação da atividade antioxidante através do método de radical catião *ABTS*^{·+} foi efetuada pelo método de microplaca, de acordo com o descrito por Thaipong et al. (2006), com algumas modificações.

Preparou-se uma solução de persulfato de potássio ($K_2O_8S_2$, Acros Organics 99%) 2,5 mM em 25 mL de água destilada. De seguida, utilizando a solução de persulfato de potássio, preparou-se 10 mL de solução de ABTS (*2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*). Esta solução foi mantida em repouso durante 16 horas, no escuro e à temperatura ambiente, de modo a obter o radical catião *ABTS*^{·+}, sendo esta a solução de trabalho.

Após 16 horas, procedeu-se à diluição da solução de trabalho, utilizando o metanol (*Sigma Aldrich* 99,8 % - retificado) até se obter uma diluição com absorvância próxima da unidade.

Numa microplaca (Nunc), pipetaram-se 20 µL de amostras de extratos com diferentes concentrações e 280 µL da diluição de ABTS por apresentar o valor absorvância mais próxima da unidade. Caso se verifique alguma precipitação do meio reacional, pode-se centrifugar durante 2 minutos a 4500 rpm e retirar 280 µL do sobrenadante. Num leitor de microplaca (BIO-RAD Model 680 Microplate Reader), leu-se a absorvância a 655 nm. Os testes foram efetuados em triplicado e utilizou-se, como controlo da sensibilidade do método, o ácido ascórbico e Trolox como antioxidantes de referência. A determinação do IC50 dos antioxidantes de referência foi feita de igual modo ao do extrato e expressa em mg/mL.

IV.3.6 – Poder de redução do ião Fe^{3+}

A avaliação do poder de redução foi efetuada de acordo com o descrito por Rajasekaran and Kalaimagal (2011) e Reis et al. (2011), com algumas adaptações.

O poder de redução foi efetuado em equivalentes de trolox. Para tal, começou-se por preparar uma solução de Trolox 1 mM, de modo a construir uma curva de calibração. A partir desta solução, por diluições sucessivas, prepararam-se os padrões com as seguintes concentrações: 0.9, 0.7, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 e 0.05 mg/mL. De seguida, numa microplaca (Nunc) pipetou-se para os poços 25 µL das soluções padrão, 25 µL de tampão de fosfato 200 mM e $p_H=6.6$ e 25 µL de ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$, (Merck) 1% (W/V). A mistura reacional foi incubada durante 20 minutos a 50°C. Após o período de incubação, adicionaram-se 25 µL de ácido tricloroacético 10% (W/V). Caso a mistura reacional apresente precipitados, dever-se-á centrifugar a 4500 rpm durante 2 minutos, retirar 50 µL do sobrenadante e adicionar 50 µL de água destilada e 10 µL de solução de cloreto de ferro (III) 0.1% (W/V). Num leitor de microplaca (BIO-RAD Model 680 Microplate Reader), leu-se a absorvância a 655 nm. As leituras foram efetuadas em triplicado. Para a análise dos extratos procedeu-se da mesma forma acima descrita, substituindo os 25 µL das soluções padrão por 25 µL de solução de extratos, com diferentes concentrações. O poder de redução é apresentado em micromole de TEAC por grama de extrato.

IV.4 – Atividade microbiana e Toxicidade geral

IV.4.1 – Atividade microbiana

A avaliação da atividade antimicrobiana, dos extratos da palmeira anã e do manjeriço obtidos por extração em Soxhlet e por extração supercrítica, foi efetuada pelo método de difusão em poços de agar, segundo descrito por Pereira et al. (2015).

Testou-se em duas bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), duas bactérias gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922) e duas leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 e *Candida albicans* ATCC 10231).

Para a aplicação do método de difusão em poços, procedeu-se à preparação dos inóculos dos microrganismos em teste. Os inóculos foram preparados através do método de crescimento, que consiste na seleção de uma colónia isolada das estirpes e preparação de uma suspensão de microrganismo de 0,5 McFarland. Esta solução foi de seguida inoculada em placas de Petri, com meio de Mueller-Hinton sólido para as bactérias (Sabouraud para as leveduras). O inóculo foi espalhado com recurso a uma zaragatoa estéril.

Posteriormente, efetuaram-se os poços no agar com, aproximadamente, 5.0 mm de diâmetro, com uma pipeta de *Pasteur*. Para os poços, pipetaram-se 50 µL de cada amostra em teste, do controlo positivo e do controlo negativo.

Os extratos de palmeira anã e de manjeriço foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO Merck 99,9%), para uma concentração final de 10 mg/mL. O DMSO foi utilizado como controlo negativo e como controlo positivo: Vancomicina para as bactérias gram-positivas, Norfloxacinina para as gram-negativas e Nystatina para as leveduras.

As placas foram incubadas a 37°C, durante 24h, para as bactérias e 48 horas para as leveduras. Após o período de incubação, os diâmetros das zonas de inibição e de ausência de crescimento foram medidos e os resultados expressos em mm. Os ensaios foram realizados em condições assépticas e em triplicado.

IV.4.2 – Toxicidade geral

O perfil de citotoxicidade dos extratos foi caracterizado em linha de célula mamária humana MCF7. As células MCF7 foram cultivadas em meio modificado de água Dulbecco's, com 10% de soro fetal bovino, DMEM +10%FBS (Dulbecco's Modified Eagle Medium), próprio para cultura de células de mamíferos, 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL estreptomicina e 0,01 mg/mL de insulina.

As células foram mantidas a 37 °C, sob uma atmosfera contendo 5% CO₂ (Fernandes 2012). A viabilidade celular foi avaliada, usando um protocolo de incubação de 24h, com o corante cristal de violeta, de acordo com um procedimento adaptado de Fernandes et al. (2010). Os extratos foram inicialmente solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e, em seguida, diluídos em tampão PBS. A concentração final de DMSO em meio de cultura foi de 0,5%. Foram realizadas duas experiências independentes, e quatro réplicas de culturas em cada ensaio independente.

IV.5 – Inibição enzimática

IV.5.1 – Inibição de Acetilcolinesterase (AChE)

O poder de inibição de acetilcolinesterase foi avaliado segundo o método de Ellmann's, com pequenas modificações (Rijo, 2013), utilizando acetilcolina como substrato e o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) como co-substrato.

Numa microplaca de 96 poços (Costar), efetuou-se uma mistura de 98 µL tampão HEPES (50 mM, pH 8.0), 30 µL de amostra e 7,5 µL AChE 0,5 U/mL. Esta mistura foi incubada durante 15 min a 25°C. A reação foi então iniciada pela adição de 22,5 µL iodeto de acetiltiocolina (1,20 mM) e 142 µL DTNB (3,03 mM). A hidrólise de acetiltiocolina foi monitorizada a cada 30s, durante 3 minutos, através da formação anião 5-tio-2-nitrobenzoato de metilo (coloração amarela), resultante da reação de DTNB com tiocolina, produzida pela hidrólise enzimática de acetiltiocolina, a um comprimento de onda de 405 nm, utilizando um leitor de microplacas (TECAN Infinito M200, Mannedorf, Suíça). Como controlo positivo usou-se a tacrina, e o solvente da amostra foi usado como controlo negativo (DMSO 1:100). Preparou-se um branco para todos os compostos testes utilizados — 98 µL de tampão HEPES (50 mM), 30 µL de amostra, 7,5 µL de tampão HEPES, 22,5 µL iodeto de acetiltiocolina (1,20 mM) e 142 µL DTNB (3,03 mM) — para o controlo positivo: 98 µL de tampão HEPES (50 mM), 30 µL de tacrina, 7,5 µL de tampão HEPES, 22,5 µL iodeto

de acetiltiocolina (1,20 mM) e 142 μ L DTNB (3,03 mM) e para o controlo negativo: 98 μ L de tampão HEPES (50 mM), 30 μ L de DMSO (1:100), 7,5 μ L de tampão HEPES, 22,5 μ L iodeto de acetiltiocolina (1,20 mM) e 142 μ L DTNB (3,03 mM). Os testes foram efetuados em triplicado.

A percentagem de inibição da atividade da AChE, devido à presença de concentrações crescentes de composto de teste, foi obtida a partir da expressão: $100 - (\frac{V_i}{V_o} \times 100)$, onde V_i é a velocidade inicial calculada na presença de inibidores e V_o é a atividade da enzima .

IV.5.2 – Inibição de Tirosinase (TyrE)

Numa microplaca de 96 poços (Costar), efetuou-se uma mistura de 180 μ L de L-tirosina (0,45 mM), 10 μ L de amostra e incubou-se, durante 5 minutos, a 30°C. Passado o tempo de incubação, adicionaram-se 10 μ L da tirosinase 0,5 U/mL. Novamente a mistura foi incubada, durante 5 minutos, a 30°C. A reação foi monitorizada a cada 2 minutos, durante 12 minutos (total de 6 leituras), através da formação do dopacromo (coloração castanha), um precursor da síntese da melanina, a um comprimento de onda de 450 nm, utilizando um leitor de microplacas (TECAN Infinito M200, Mannedorf, Suíça). Como controlo positivo usou-se o ácido kógico, e o solvente da amostra foi usado como controlo negativo (DMSO 1:10). Preparou-se um branco para todos os compostos testes utilizados — 180 μ L de L-tirosina (0,45 mM), 10 μ L de amostra e 10 μ L de tampão PBS. Para o controlo positivo, 180 μ L de L-tirosina (0,45 mM), 10 μ L de ácido Kógico (10mg/mL ,1:10) e 10 μ L de tampão PBS (pH=6,8, 50 mM) e, para o controlo negativo, 180 μ L de L-tirosina (0,45 mM), 10 μ L de ácido kógico e 10 μ L de tampão PBS. Os testes foram efetuados em triplicado.

A percentagem de inibição da atividade da TyrE, devido à presença de concentrações crescentes de composto de teste, foi obtida a partir da expressão: $100 - (\frac{V_i}{V_o} \times 100)$, onde V_i é a velocidade inicial calculada na presença de inibidores e V_o é a atividade enzima.

IV.6 – Análise por GC-MS e HPLC-DAD-MS

IV.6.1 – GC e GC-MS

IV.6.1.1 – Cromatografia Gasosa

Os ensaios de cromatografia gasosa (GC) foram realizados num cromatógrafo Perkin Elmer 8700, equipado com dois Detetores de Ionização de Chama (FIC) e com duas colunas de polaridade diferente: DB-1 de sílica fundida, de fase imobilizada de metilsilicone, (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.) e DB-17HT de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.). A temperatura do forno foi programada de 45°C a 175°C, com incrementos de 3°C/min e, subsequentemente, a 15°C/min até 300°C e mantida isotérmica durante 10 min. A temperatura do injetor e dos detetores foi programada a 290°C e 280°C, respetivamente. Como gás de arrastamento, utilizou-se o hidrogénio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s. A relação de repartição de fluxo, 1:50. A composição percentual dos óleos foi determinada pela integração das áreas dos picos sem utilização de fatores de correção.

IV.6.1.2 – Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massa

Na Cromatografia Gás-Espectrometria de Massa (GC-MS), utilizou-se um Autosystem XL equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.) ligado a um Perkin-Elmer Turbomass (versão de programa 4.1). A temperatura do forno foi programada de 45 a 175°C, com incrementos de 3°C/min e, subsequentemente, a 15°C/min até 300°C e mantida isotérmica durante 10 min. A temperatura da linha de transferência foi programada a 280°C; a temperatura da câmara de ionização a 220°C; o gás de arrastamento, hélio, foi ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s; relação de repartição de fluxo, 1:40; energia de ionização, 70 eV; corrente de ionização, 60 µA; gama de massas, 40-300 u; tempo de varrimento, 1 s.

Os compostos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção, em relação aos dos n-alcanos C₈-C₂₅. Os espectros de massa por comparação com os de padrões comerciais, compostos de referência presentes em óleos existentes no laboratório e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa.

IV.6.2 – HPLC-DAD-MS

A identificação e caracterização dos compostos fenólicos presentes no extrato da palmeira anã foram realizadas por HPLC-DAD MS. Os ensaios foram efetuados num sistema composto por um HPLC *Dionex Ultimate* 3000, com uma bomba binária HPG3200, um amostrador automático WPS300 com forno de coluna TCC3000 e um detetor DAD 3000, acoplado em linha com um espectrómetro de massa de armadilha de iões LCQ *Fleet*, equipado com uma fonte de ionização por *electropray* (ESI) (*Thermo Scientific*).

As separações foram realizadas numa coluna de fase-reversa Kinetex® C18 100 Å (150 x 4.6 mm x 5 µm, Phenomenex), à temperatura controlada de 35°C, em forno termostaticado a 35°C, usando um caudal de 0.350 mLmin⁻¹. Uma amostra (10 µL) foi injetada na coluna através de um injetor Rheodyne com um loop de 25 µL, usando uma fase móvel, constituída por água acidulada com 0.1% (v/v) de ácido fórmico (A) e por acetonitrilo (B). O gradiente de eluição foi o seguinte: 0-15 min, gradiente linear de 0% a 15% B; 15-30 min, gradiente linear de 15% a 20% B; 30-35 min, gradiente linear até 50% B; 35-40 min, gradiente linear até 100% B; 40-44 min, isocrático 100%; 44-45 min gradiente linear 0% de B, com reequilíbrio da coluna durante 10 minutos. A deteção dos constituintes da amostra foi monitorizada num intervalo de c.d.o. entre 250 e 370 nm. A aquisição e o processamento dos resultados obtidos foram feitos através do programa ChromQuest para o detetor de diodos HPLC

A ionização ESI foi efetuada em modo negativo, e os parâmetros instrumentais foram os seguintes: voltagem do spray de ionização, +4,5 kV; voltagem do capilar de transferência, -18 V; tensão das lentes de focagem, +58 V; gás de nebulização (N₂), 80 unidades arbitrárias; gases de secagem, 10 unidades arbitrárias; temperatura do capilar de transferência, 270° C. Os espectros correspondem à média de 20-35 digitalizações e foram adquiridos num intervalo de 100-1000 Da. Os ensaios de MS/MS foram realizados com uma janela de isolamento de 2 Da, uma energia de colisão entre 22 e 30% e uma energia de ativação de 30 msec. A aquisição e processamento de dados foram realizados utilizando o *software* Xcalibur 2.2 SP1.48.

IV.7 – Análise estatística e tratamento de dados

Em todos os ensaios as medições foram feitas, pelo menos, em triplicado. Os resultados foram apresentados sob a forma de média ± desvio padrão.

Os dados foram tratados estatisticamente, usando o programa Excel para Windows, através de análise de variância (ANOVA - One-way Analysis of Variance - análise de variância).

As diferenças significativas entre médias foram identificadas recorrendo aos testes de Tukey HSD, de Scheffé ou ao T-Test e para as correlações e verificação de linearidade foi usado o teste de Pearson.

Para as curvas de calibração e ensaios realizados, determinaram-se os limites de deteção e quantificação (LOD e LOQ), através do método baseado em parâmetros da curva de calibração, de acordo com Shrivastava and Gupta (2011). Este método será o mais subjetivo uma vez que se apoia em considerações estatísticas.

As equações utilizadas foram as seguintes:

$$LOD = \frac{3Sa}{b} \quad \text{e} \quad LOQ = \frac{10Sa}{b}$$

sendo **Sa** a estimativa do desvio padrão da ordenada na origem e **b** o declive da reta.

V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 – Obtenção de extratos de palmeira anã, manjeriço e óleo essencial de manjeriço, por extração em Soxhlet e hidrodestilação

A amostra vegetal da palmeira anã e do manjeriço apresentavam um teor de humidade de 26,7% e 92,74 %, respetivamente. Para o manjeriço (folhas frescas e secas), efetuou-se a extração em Soxhlet (metanol e etanol) e hidrodestilação (água destilada). Para a palmeira anã, efetuou-se a extração somente em Soxhlet (metanol e hexano). O rendimento das extrações foi determinado na base seca, através da razão entre a massa de extrato obtido e a massa de material vegetal utilizado no processo extrativo. O resultado encontra-se apresentado na tabela 4.

Tabela 4- Rendimentos obtidos na extração por Soxhlet (manjeriço e palmeira anã) e na hidrodestilação do manjeriço.

Tipo de Extração	Planta	Solvente	Rendimento (%)
Hidrodestilação	Folha de manjeriço seca	H ₂ O Destilada	0,35
	Folha de manjeriço Fresco	H ₂ O Destilada	0,32
Soxhlet	Folha de manjeriço seca	MeOH	17,81
		EtOH	9,63
	Folha de manjeriço Fresco	MeOH	32,23
		EtOH	32,04
Folha de palmeira anã seca	MeOH	17,98	
	Hexano	2,73	

O rendimento do óleo essencial do manjeriço fresco e seco obtido é de 0,352% e 0,324 %, respetivamente. Segundo Ijaz et al. (2008), o rendimento da extração do óleo essencial do manjeriço seco varia entre 0,5 % e 0,8%, no verão e no inverno, respetivamente. Num

outro estudo realizado por Politeo, Jukic, and Milos (2007) chegou-se a um rendimento de 0,62% para óleo essencial extraído a partir de folha seca de manjeriço. Segundo Occhipinti et al. (2013), o rendimento da extração de óleo essencial do manjeriço varia entre 0,3 e 1,2% (w/w). O resultado obtido neste trabalho, na hidrodestilação quer da folha fresca como da folha seca, encontra-se dentro do intervalo referido por estes autores. Salienta-se que, neste caso, o manjeriço é de plantaço comercial e não espontâneo, pelo que as suas características podem diferir de outras já estudadas.

A extração em Soxhlet, da folha fresca e seca do manjeriço, teve um rendimento de 32,23% para o extrato de metanol e de 32,04 % para o extrato de etanol. Este rendimento, comparativamente ao rendimento da folha seca — 17,81% para o extrato de metanol e 9,63% extrato de etanol, — é superior, e isso deve-se ao facto de em folhas frescas serem, muitas vezes, extraídos compostos como clorofilas e pigmentos da planta, o que faz aumentar a massa extraída. A extração de produtos naturais é, preferencialmente, efetuada em material vegetal seco, devido ao facto de o material vegetal fresco estar mais propenso a sofrer decomposição e o seu armazenamento ser, por isso, mais restrito.

V.2 – Obtenção de extratos de manjeriço e óleo volátil por extração supercrítica com CO₂

O rendimento dos extratos supercríticos com e sem óleo efetuados a 400 bar e 333,15 K e do óleo volátil extraído a 90 bar e 60°C encontra-se apresentado nas tabelas 5, 6 e 7. Para o extrato supercrítico com óleo (inicialmente) e sem óleo, obteve-se um rendimento de 2,19 % e 2,17%. Apesar de um dos extratos ter sido obtido a partir de um resíduo de planta onde foi extraído previamente o óleo volátil, a diferença do rendimento na obtenção do extrato com óleo (Tabela 5) e sem óleo (Tabela 7) é praticamente nula, considerando que o óleo volátil extraído representa apenas 0,409 % da massa total da planta (Tabela 6).

Tabela 5- Rendimento obtido da extração supercrítica com CO₂, do material vegetal do manjeriço (folhas secas) a uma temperatura de 333,15 K e pressão de 400 bar.

<i>Ensaio</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>VCO₂ (L)</i>	<i>Rendimento (%)</i>
1	16,42	11,94	0,473
2	28,44	21,96	0,763
3	50,37	39,99	1,12
4	80,54	68,70	1,26
5	125,94	110,98	1,80
6	171,24	155,60	2,09
7	231,96	212,22	2,19

Segundo Occhipinti et al. (2013), o rendimento da extração com CO₂ supercrítico do manjeriço varia entre 0,4% a 1,90 % (w/w). Comparando o rendimento obtido com este intervalo, verifica-se que este é superior, facto que pode ser explicado pela diferença de pressão (mais 100 bar do que referência citada) utilizada no processo extrativo. Num outro estudo (Zeković et al. 2014) obteve-se um rendimento de 1,88%, também abaixo do valor obtido neste estudo.

Tabela 6- Rendimento obtido da extração supercrítica com CO₂, do material vegetal do manjeriço (folhas secas) a uma temperatura de 333,15 K pressão de 90 bar.

<i>Ensaio</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>VCO₂ (L)</i>	<i>Extracto total</i>	<i>Óleo Volátil</i>
			<i>Rendimento (%)</i>	<i>Rendimento vs Óleo Essencial (%)</i>
1	19,00	162,25	0,147	41,90
2	35,82	303,28	0,171	48,78
3	62,64	521,75	0,229	65,47
4	99,64	830,38	0,247	70,47
5	159,64	1333,90	0,409	116,8

Em relação à extração do óleo volátil, o rendimento apresentado foi determinado em relação à massa da planta utilizada e em função do rendimento obtido na hidrodestilação da folha seca de manjeriço (% de óleo essencial, 0,352). Verificamos, desta forma, que é possível obter um óleo volátil por ESC, com rendimentos semelhantes aos obtidos por hidrodestilação e, como será discutido no ponto **V.6**, com composições idênticas.

Tabela 7- Rendimento obtido da extração supercrítica com CO₂, do material vegetal do manjeriço (folhas secas) a uma temperatura de 333,15 K e pressão de 400 bar, após uma extração prévia do óleo volátil a uma temperatura de 333,15 K e pressão de 90 bar.

Ensaio	Tempo (min)	VCO₂ (L)	Rendimento (%)
1	16,35	13,59	0,307
2	36,35	28,52	0,789
3	67,13	55,81	1,19
4	110,30	90,68	1,42
5	167,77	148,15	1,88
6	231,00	203,50	2,17

V.3 – Avaliação de atividade antioxidante

V.3.1 – Determinação de polifenóis – Método Convencional vs. Microplaca

A determinação de fenóis totais no extrato da palmeira anã foi efetuada recorrendo à técnica de Folin-Ciocalteu convencional (num espectrofotómetro de UV-Vis) e em microplaca de 96 poços (UV-Vis). A utilização da microplaca para a determinação espectrofotométrica tem ganho muita relevância devido à facilidade de aplicação e pelo facto de ser mais rápida, menos dispendiosa e consumir menos solventes.

A validação interlaboratorial do método de microplaca para a determinação foi efetuada por Bobo-García et al. (2015), comparando-o com o método espectrofotométrico convencional. Nesse estudo, realizado no mesmo comprimento de onda para os dois métodos, verificou-se que as diferenças dos resultados entre os dois métodos não eram significativas, para um nível de confiança de 95 %.

Neste trabalho, essa comparação foi efetuada aplicando os dois métodos a diferentes comprimentos de ondas, tendo chegado aos seguintes resultados:

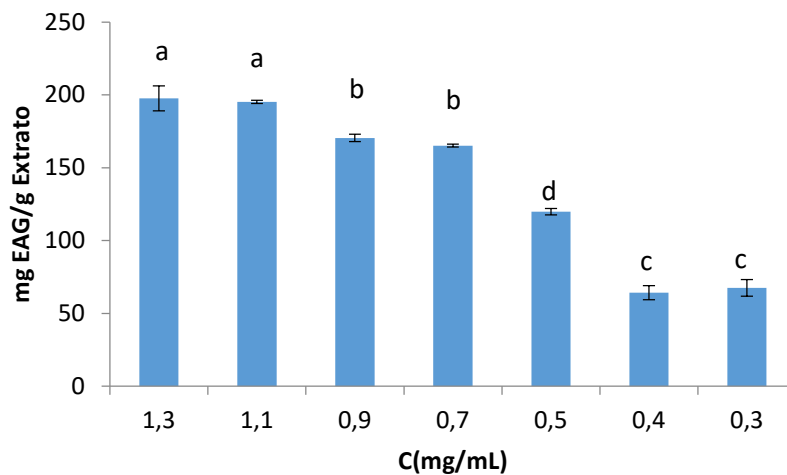


Figura 12- Valores de teores em polifenóis, determinados em mg EAG/g de extrato, pelo método convencional a 765 nm. Letras iguais indicam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P < 0,05$).

Para o método convencional (Figura 12), verifica-se que após as concentrações de extrato de 0,7 mg/mL o valor de polifenóis decresce significativamente para as valores mais baixos de extrato a analisar (menor que 0,5 mg/mL). Para concentrações mais baixas, 0,3 e 0,4 mg/mL, o teor em polifenóis é claramente menor e, considerando os valores de desvio, são próximos do limite de quantificação ($LOQ = 61,82$ mg/mL), determinado na reta de calibração (Anexo A), não apresentando assim qualquer validade. Desta forma, os valores que apresentaram significados estatísticos para o teor de polifenóis determinado são os de, aproximadamente, $197,72 \pm 8,60$ mg EAG/g extrato, correspondentes aos valores de concentração mais elevados do extrato preparado.

Na Figura 13, são apresentados os valores de polifenóis obtidos pelo método de microplaca a 655 nm. Verifica-se que entre os valores de 0,3 a 1,3 mg/mL de concentração dos extratos preparados, o teor de polifenóis apresenta valores entre $158,80 \pm 11,22$ e $180,11 \pm 4,85$ mg EAG/g extrato.

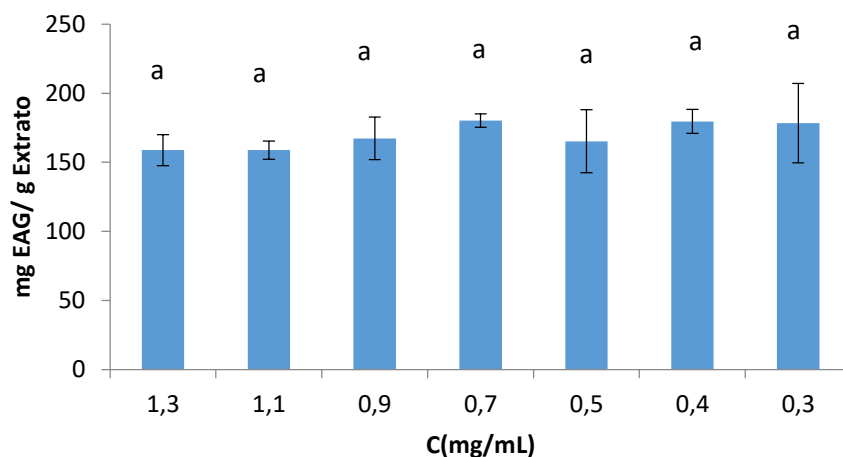


Figura 13- Valores de teores em polifenóis, determinados em mg EAG/g de extrato, pelo método de microplaca a 655 nm. Letras iguais indicam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P < 0,05$).

A análise estatística entre os valores de teor em polifenóis, determinados pelos dois métodos, foi efetuada recorrendo ao método ANOVA e com os testes de Tukey HSD e de Scheffé ($P < 0,05$), para confirmação. Verificou-se que para o método em microplacas de 96 poços, os valores médios obtidos para o teor de polifenóis nas diferentes concentrações de extrato estudadas (1,3 -0,3 mg/mL) não eram significativos. Contudo, para o método convencional, os valores das médias obtidas apresentavam diferenças significativas, como se pode facilmente verificar na Figura 12.

Posteriormente, optou-se por comparar exclusivamente os valores médios obtidos para as maiores três concentrações de extrato estudadas (0,9 mg/mL; 1,1 mg/mL; e 1,3 mg/mL) em ambos os métodos. Assim, se para o método de microplaca, como referido anteriormente, os valores médios obtidos não apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$), para o método convencional verifica-se que, na amostra de concentração 1,3 mg/mL com o de concentração 1,1 mg/mL, a diferença não é significativa, mas a comparação do teor de polifenóis na amostra de 1,3 mg/mL com a de 0,9 mg/mL, ou na de 1,1 mg/mL com a de 0,9 mg/mL apresenta valores significativamente diferentes de acordo com os testes Tukey HSD e de Scheffé ($P < 0,05$).

Comparando diretamente o teor de polifenóis determinado pelos dois métodos a concentrações iguais, verifica-se que a 1,3 mg/mL existe uma probabilidade de 99% de serem diferentes, tal como para a concentração de 1,1 mg/mL. Contudo, para a concentração de 0,9 mg/mL a diferença no teor de polifenóis determinados pelos dois métodos não é significativa.

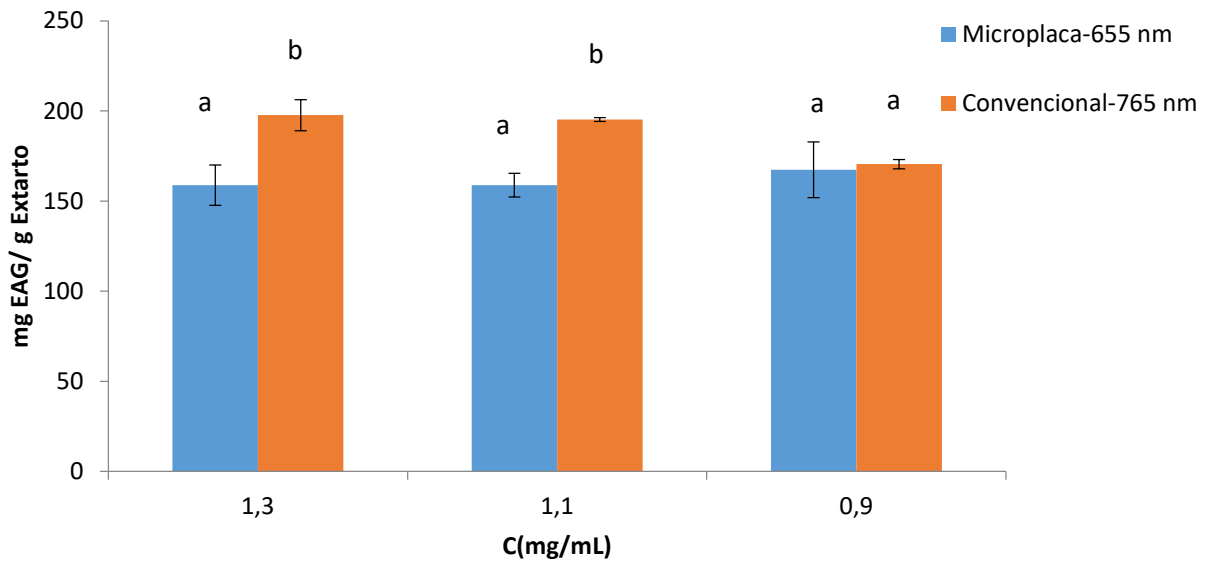


Figura 14- Comparação do teor de polifenóis determinado pelos dois métodos. Letras iguais significam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P < 0,05$).

Dada a consistência dos resultados apresentados pelo método de microplaca e a facilidade de realizar ensaios em triplicado, economizando reagentes e tempo, optou-se pela utilização dos futuros ensaios em microplaca de 96 poços.

Para o teor em flavonóides nas amostras, utilizou-se o método colorimétrico de cloreto de alumínio, como descrito anteriormente. Este método baseia-se na formação de complexos entre grupos ceto e hidroxilos dos flavonóides presentes na amostra. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 15. Nestes ensaios, optou-se por utilizar exclusivamente as duas concentrações mais elevadas do extrato (1,1 mg/mL e 0,9 mg/mL), considerando os resultados obtidos no ensaio anterior.

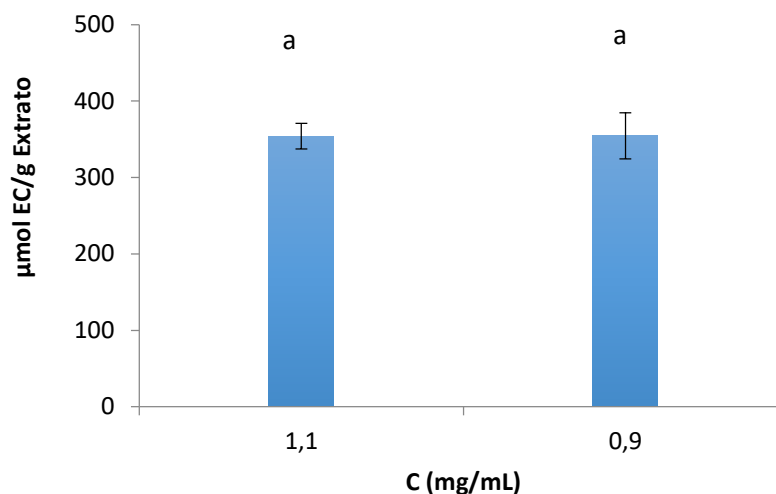


Figura 15- Valores de teor em flavonóides para o extrato metanólico das folhas da palmeira anã. Letras iguais indicam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P < 0,05$).

O teor de flavonóides na amostra do extrato da palmeira anã foi determinado para duas concentrações diferentes (1,1 e 0,9 mg/mL) de extrato. Para 1,1 mg/mL, obteve-se um teor de $354,05 \pm 16,90 \mu\text{mol}_{\text{EC}} / \text{g}$ extrato e, para 0,9 mg/mL, $354,43 \pm 30,23 \mu\text{mol}_{\text{EC}} / \text{g}$ extrato. A constituição química dos extratos da palmeira anã não se encontra muito estudada; mesmo assim, estudos realizados por Williams, (1973) e Benmehdi et al. (2012) servem como suporte aos resultados obtidos neste trabalho. O estudo efetuado por Williams, (1973) permitiu identificar a presença de flavonóides no extrato de folhas da palmeira anã, tais como flavona C-glicósidos e tricina 5-O-glicósido. Igualmente, em Benmehdi et al. (2012), o estudo fitoquímico preliminar com extrato metanólico de folhas da palmeira detetou a presença de flavonóides.

Da análise estatística entre os valores de teores em flavonóides, determinados para as duas concentrações, verifica-se que não apresenta valores significativamente diferentes de acordo com os testes Tukey HSD e de Scheffé.

V.3.1.1 – Determinação dos polifenóis e flavonóides nos extratos do manjeriço

A determinação do teor em polifenóis nos extratos de manjeriço foi efetuada de acordo com a opção tomada no ponto supra (V3.1) e os resultados são apresentados na Figura 16 e Figura 17. Como se pode verificar pela Figura 16, onde é apresentado o resultado do teor

em polifenóis dos extratos obtidos por extração em Soxhlet das folhas de manjeriço seco e fresco, o que apresenta maior teor em polifenóis é o extrato etanólico do manjeriço seco. Num estudo realizado por Vlase et al. (2014), verificou-se que o extrato etanólico de manjeriço possui $175,57 \pm 2,73$ mg EAG/g extrato, sendo que, neste nosso caso, os valores são menores. Como referido, a origem e condições de cultivo desta planta s influenciam de forma notória a composição e atividade dos extratos.

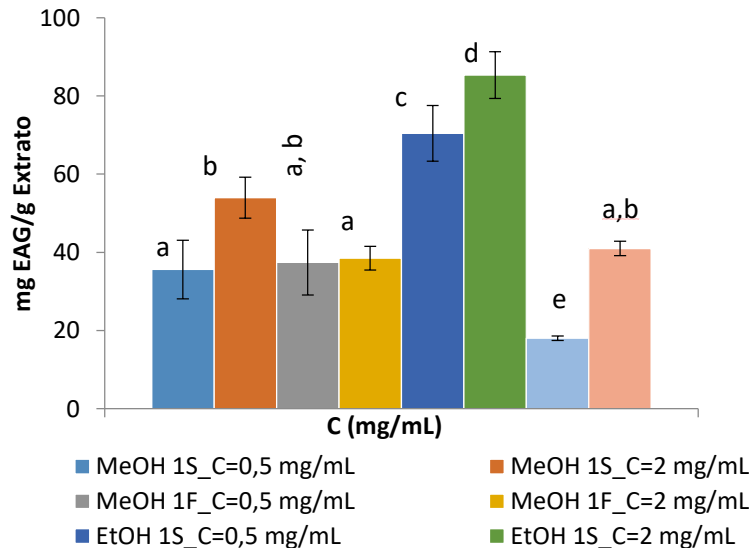


Figura 16- Teor em polifenóis dos extratos de manjeriço em Soxhlet, determinado por método de microplaca. Letras iguais indicam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P < 0,05$).

Verifica-se, ainda, que os extratos secos apresentam maior quantidade de polifenóis quando comparados com os obtidos da folha fresca. Estes extratos foram os que apresentaram menor rendimento (Tabela 1), quando comparados com os obtidos da planta fresca. Contudo, a existência de pigmentos que se podem degradar durante o processo de secagem, ou de outros compostos, parece favorecer o incremento dos polifenóis nos extratos finais da planta seca.

Considerando que na extração supercrítica só as folhas secas de manjeriço foram utilizadas, optou-se por comparar, na Figura 17, os valores de polifenóis dos extratos obtidos em Soxhlet e os obtidos por ESC a partir da planta seca. Mais uma vez, verifica-se que o extrato que possui maior teor em flavonóides é o etanólico, sendo que uma possível justificação poderá estar relacionada com a diferença de polaridade entre os solventes, que diminui no sentido etanol, metanol e fluido supercrítico.

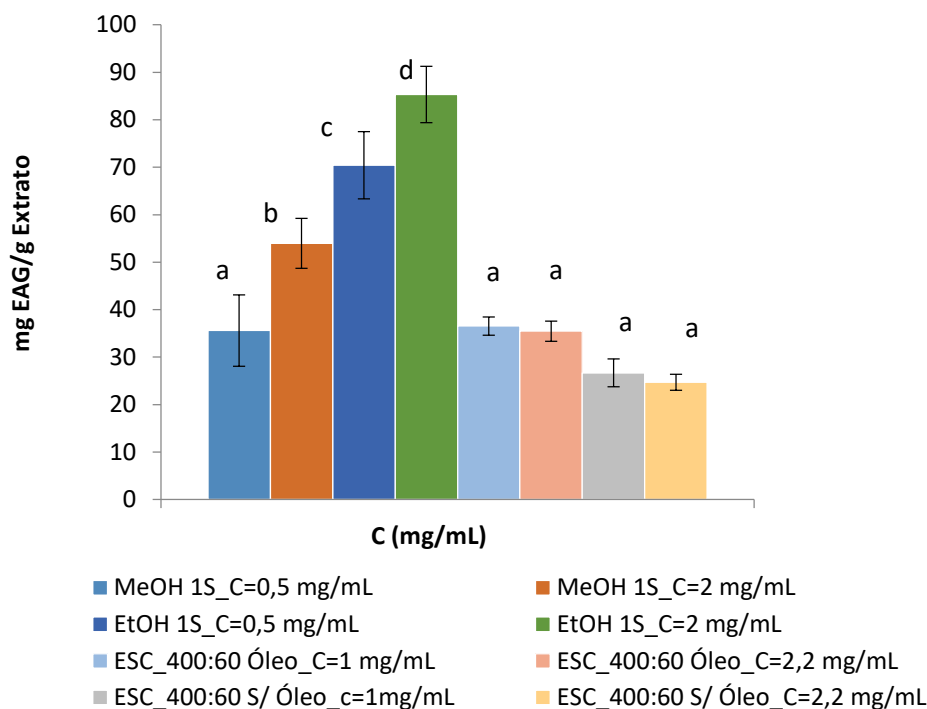


Figura 17- Teor de polifenóis nos extratos de manjericão, comparação entre Soxhlet (folhas secas) e ESC. Letras iguais significam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P < 0,05$).

O extrato supercrítico sem o óleo volátil, inicialmente, apresenta um valor $24,73 \pm 1,68$ mg EAG/g extrato, para uma concentração de 2,2 mg/mL, sendo este o menor valor obtido para os diferentes extratos. Para além da menor polaridade do CO_2 supercrítico, a prévia extração do óleo volátil, que representa cerca de 0,4% da massa total, influencia o teor de polifenóis finais.

Na Figura 18, apresenta-se o resultado da determinação do teor de flavonóides nos extratos obtidos em Soxhlet com diferentes solventes (manjericão fresco e seco). De acordo com o estabelecido para os polifenóis, na Figura 19 comparam-se os valores obtidos para os extratos obtidos a partir da planta seca, exclusivamente, utilizando a técnica de Soxhlet e da ESC.

Na Figura 18, verifica-se que o extrato que apresenta maior teor de flavonóides é o metanólico do manjericão seco para a concentração de 10 mg/mL, apresentando um teor de $59,430 \pm 3,130$ $\mu\text{mol EC/g}$ extrato. Analisando os valores médios obtidos para as diferentes concentrações estudadas (≈ 8 -10 mg/mL), constata-se que para o extrato metanólico obtido da planta seca (MeOH 1S) existe uma diferença estatística significativa, sendo que nos outros casos tal não sucede ($P < 0,05$).

Por outro lado, ao contrário do que sucedeu para os valores de polifenóis nos extratos conseguidos com estes dois solventes, a quantidade de flavonóides totais é maior ou semelhante para o solvente com menor polaridade, o metanol, quando obtido a partir da planta nas mesmas condições.

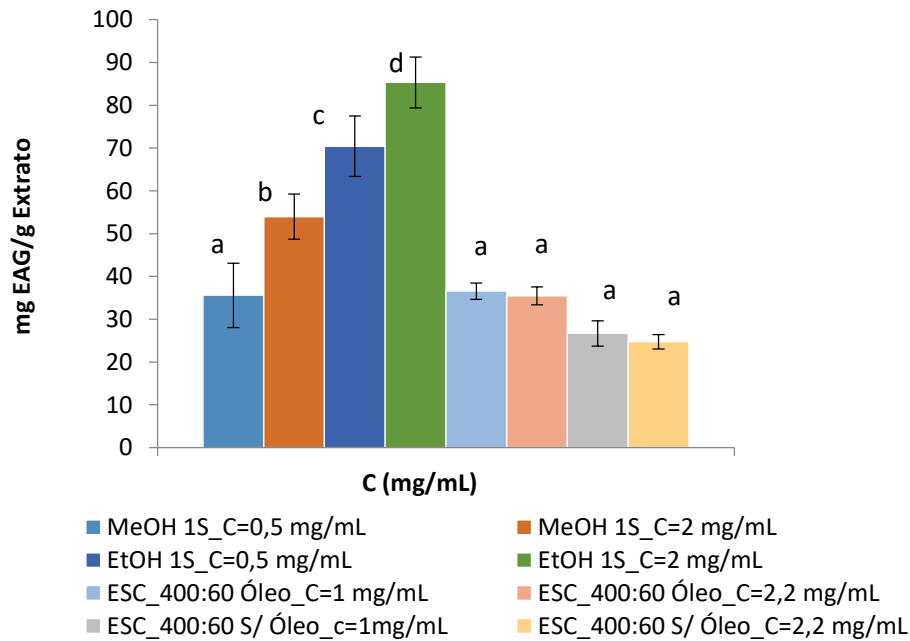


Figura 18- Teor de flavonóides dos extratos de manjeriço em Soxhlet, determinados pelo método de microplaca. Letras iguais significam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P < 0,05$).

Na Figura 19, dos resultados obtidos para os extratos da planta seca, exclusivamente, utilizando a técnica de Soxhlet e da ESC, verifica-se que o extrato supercrítico com óleo (ESC_400:60 óleo) é o que apresenta maior teor em flavonóides.

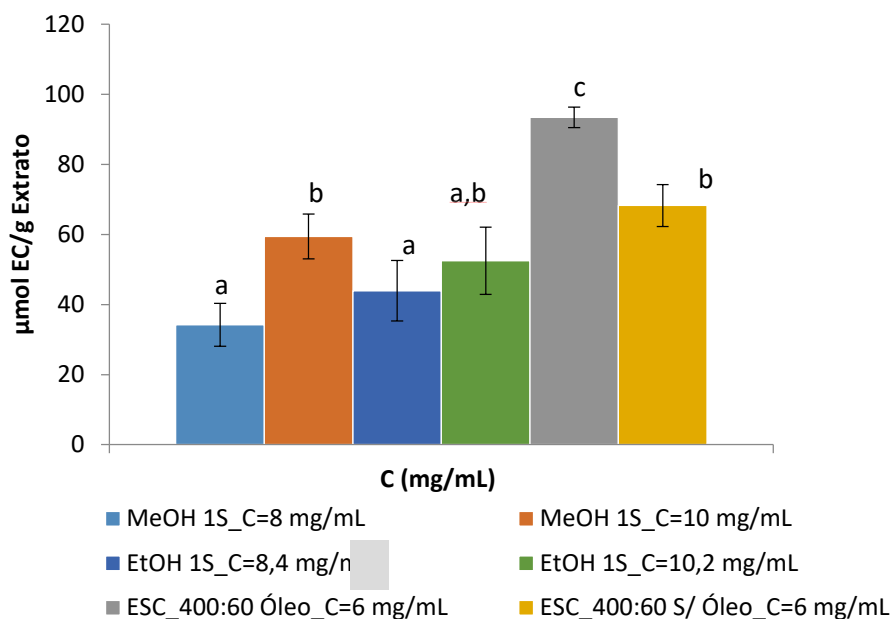


Figura 19- Teor de flavonóides dos extratos de manjeriçã, comparação o Soxhlet (folhas secas) e ESC, determinado pelo método de microplaca. Letras iguais significam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P < 0,05$).

Estes resultados confirmam a aparente maior afinidade da extração dos flavonóides, ao contrário dos polifenóis, com solventes menos polares, uma vez que o CO_2 supercrítico é o menos polar entre os utilizados. Por outro lado, tal como se tinha verificado para os polifenóis, a presença inicial dos compostos voláteis na planta (sem prévia extração do óleo volátil), por exemplo (ESC_400:60 Óleo), apresenta maior teor em flavonóides.

V.3.2 – Determinação da atividade antioxidante do extrato da palmeira anã

A atividade antioxidante do extrato da palmeira anã foi avaliada recorrendo a técnicas como DPPH, ABTS e poder de redução. Esta avaliação foi efetuada após a determinação dos fenóis totais e do teor em flavonóides, que não sendo referidos na literatura como técnicas de avaliação da capacidade antioxidante, permitem aferir, no entanto, acerca desta capacidade, considerando que são metabolitos secundários mais abundantes e importantes no reino vegetal (Ajila et al. 2011; Jin Dai and Mumper 2010).

Para a avaliação da atividade antioxidante pelos ensaios de DPPH e ABTS, constroem-se curvas de inibição para diferentes concentrações de extrato e compostos de referência apresentadas nas Figuras 20-23. A representação gráfica dos resultados para a inibição dos diferentes compostos permite analisar o comportamento dos mesmos, como potenciais

inibidores, até se atingir o valor de 100%, numa gama completa de valores. Para alguns dados da literatura o IC50 é, muitas vezes, determinado com quatro ensaios, sendo dois acima dos 50% de inibição e os outros dois abaixo desse valor.

Estas curvas foram analisadas recorrendo ao Excel, de modo a verificar a zona de linearidade da mesma, para o cálculo de IC50, de acordo com o teste Pearson. Determinou-se também LOD e LOQ (Shrivastava and Gupta 2011), para as retas utilizadas na determinação do IC50 do extrato e dos compostos de referências, recorrendo aos respetivos parâmetros (apresentados no Anexo E).

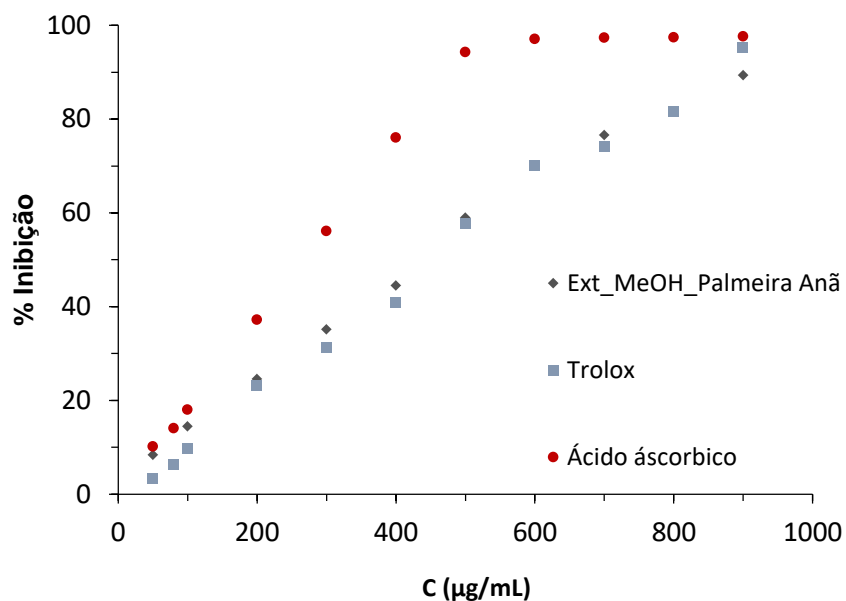


Figura 20- Curvas de inibição para o extrato metanólico da palmeira anã e dos compostos de referências (trolox e ácido ascórbico), no ensaio de DPPH.

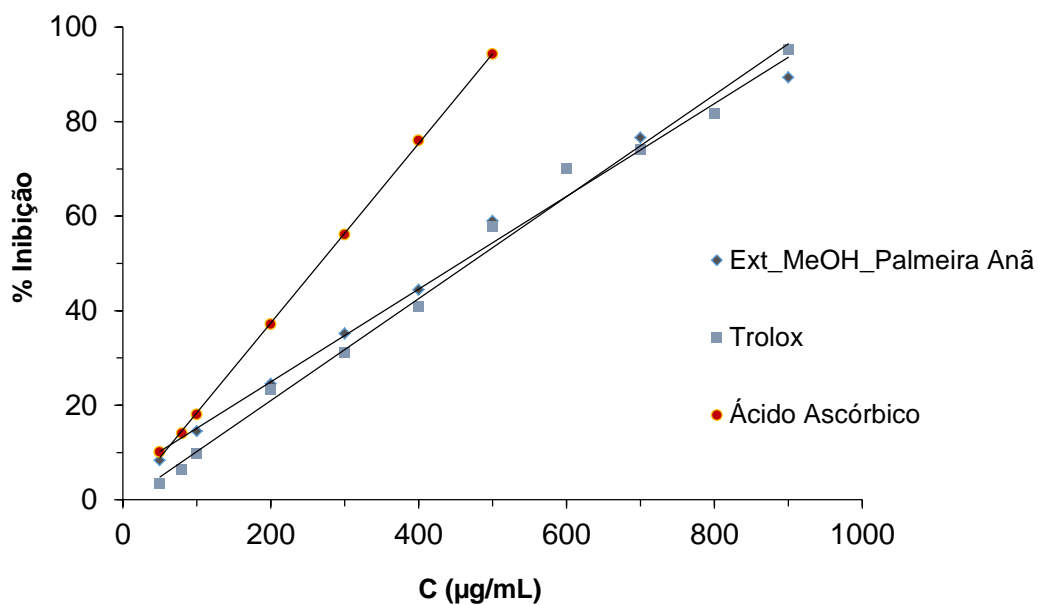


Figura 21- Retas obtidas para o extrato metanólico da palmeira anã e dos compostos de referência (trolox e ácido ascórbico), no ensaio de DPP, considerando a zona da linearidade.

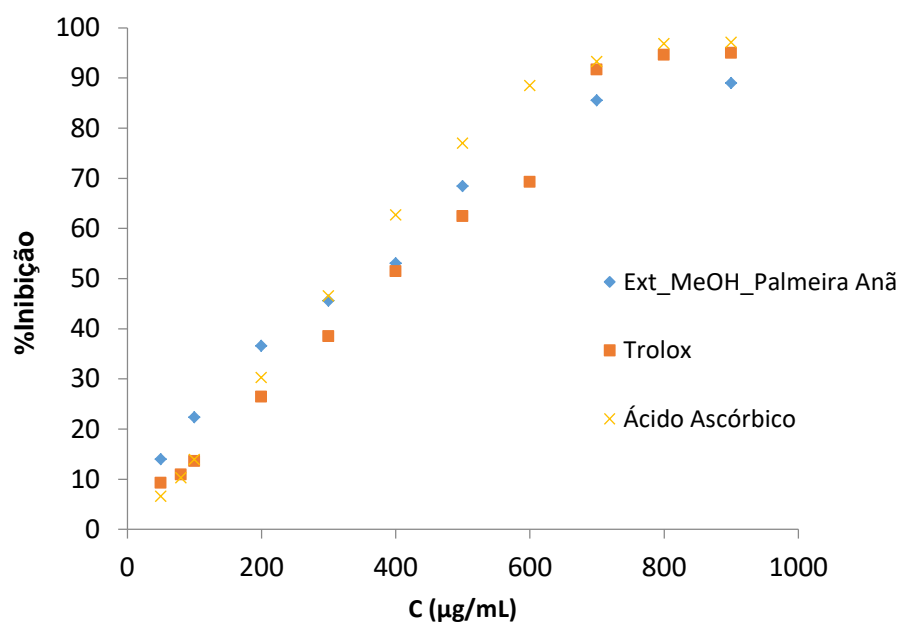


Figura 22- Curvas de inibição para o extrato metanólico da palmeira anã e dos compostos de referências (trolox e ácido ascórbico), no ensaio de ABTS.

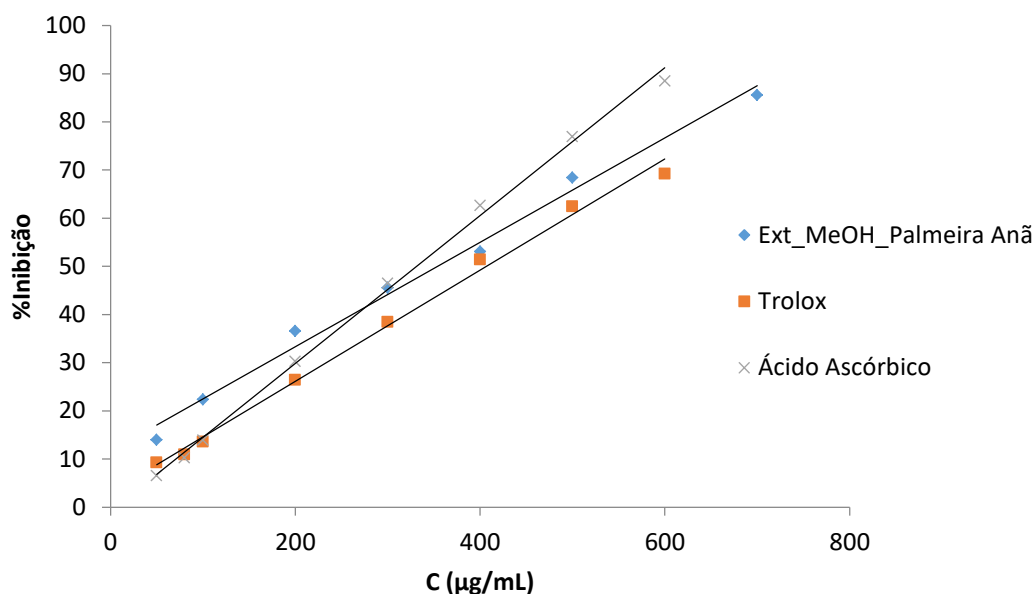


Figura 23- Retas obtidas para o extrato metanólico da palmeira anã e dos compostos de referência (trolox e ácido ascórbico), no ensaio de ABTS, considerando a zona da linearidade.

Os valores de IC₅₀ (mg/mL) foram determinados considerando as retas traçadas na zona da linearidade nos ensaios de inibição de DPPH e ABTS. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 8.

Tabela 8- Valores de IC₅₀ (mg/mL) do extrato metanólico da palmeira anã e dos compostos de referência.

Extrato/Composto de referência	Ensaio DPPH	Ensaio ABTS
Ext_MeOH_Palmeira Anã	0,455±0,087	0,354±0,082
Trolox	0,471±0,088	0,425±0,084
Ácido ascórbico	0,266±0,022	0,331±0,050

Analisando os valores apresentados na Tabela 9, verifica-se que o ácido ascórbico, usado como referência nestes ensaios, é o que apresenta melhor atividade quer no ensaio de DPPH (0,266±0,022 mg/mL) quer no de ABTS (0,331±0,050 mg/mL). O extrato metanólico da palmeira apresenta um IC₅₀ de 0,455±0,087 mg/m no ensaio de DPPH e 0,354±0,082 mg/mL no ensaio de ABTS. Já o trolox apresentou uma atividade inferior à do nosso extrato

nos dois ensaios. Quer no ensaio de DPPH como no de ABTS, quanto menor for o valor de IC50 do extrato/composto de referência, melhor é a sua capacidade antioxidante.

Segundo Medronho (2015), a análise de extratos de várias partes da palmeira anã (sementes, peles, folhas e polpa) pelo ensaio de DPPH permitiu verificar que o extrato das folhas apresenta um IC50 de $346,08 \pm 12,63 \mu\text{g/mL}$ e que o extrato das sementes apresenta um menor valor de IC50, logo, melhor atividade antioxidante: $81,28 \pm 1,79 \mu\text{g/mL}$. Comparando o valor obtido no extrato metanólico da folha da palmeira anã ($0,455 \pm 0,087 \text{ mg/mL}$), verifica-se que a diferença existente ($108 \mu\text{g/mL}$) não é significativa, considerando as técnicas aplicadas e o método utilizado no processo extrativo.

Outro dos testes utilizados para avaliar a capacidade de redução de extratos de plantas é o da sua capacidade em reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} , sendo os resultados apresentados na Figura 24.

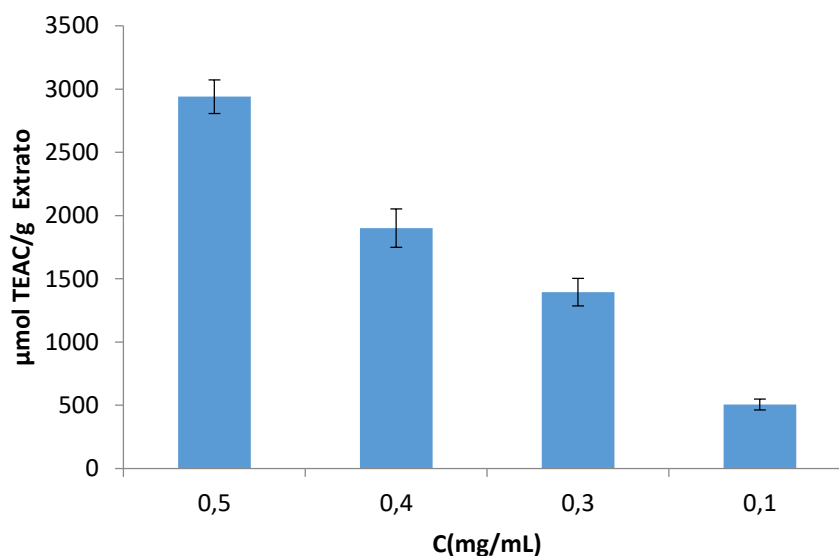


Figura 24- Resultados da avaliação do poder de redução do extrato metanólico da palmeira anã.

Verifica-se que o extrato metanólico das folhas da palmeira anã apresenta uma boa capacidade de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} , como se pode observar no gráfico apresentado na Figura 24. Numa gama de concentração relativamente baixa, 0,1- 0,5 mg/mL, o poder de redução do extrato metanólico da palmeira varia entre $505,65 \pm 43,81 \mu\text{mol TEAC/g}$ extrato e $2939,36 \pm 132,85 \text{ mg TEAC/g}$ extrato. Neste método, contrariamente ao que se verifica no ensaio de DPPH e ABTS, quando maior for a concentração dos extratos preparados, maior é a capacidade de reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} .

V.3.3 – Determinação da atividade antioxidante dos extratos do manjericão

Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos de manjericão, realizaram-se ensaios com radical DPPH, radical catião ABTS e poder de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} .

Os valores obtidos para os ensaios de DPPH e ABTS são apresentados na Tabela 9. Os extratos de manjericão obtidos por diferentes meios apresentaram um valor de IC50 elevado, quando comparado com antioxidantes padrão, como trolox e ácido ascórbico. Salienta-se que, quanto menor for o valor de IC50, maior é o poder antioxidante dos extratos. Apesar da menor atividade verificada nos extratos de manjericão, também se pode constatar que os extratos obtidos por extração em Soxhlet apresentam melhor atividade do que os extratos obtidos com CO_2 supercrítico.

Tabela 9- Valores de IC50 (mg/mL) dos extratos do manjericão e dos compostos de referências.

Extrato/Composto de referência	Ensaio DPPH	Ensaio ABTS
MeOH 1S	3,052±0,358	4,264±0,216
MeOH 1F	2,906±0,358	3,685±0,337
EtOH 1S	3,985±0,546	5,384±0,234
EtOH 1F	4,273±0,175	7,474±0,295
ESC_400:60_óleo	5,634±0,196	1,742±0,011
ESC_400:60_S/ óleo	6,196±0,150	4,6±0,304
Trolox	0,471±0,088	0,425±0,084
Ácido ascórbico	0,266±0,022	0,331±0,050

Contudo, existem autores que referem que extratos de manjericão possuem uma boa capacidade antioxidante. Segundo Vlase et al. (2014), o extrato etanólico de folhas secas de manjericão apresenta um IC50 de 124.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este valor é muito inferior ao valor de IC50 obtido para todos os extratos avaliados neste trabalho. Nos extratos supercríticos, realizados por Filip et al. (2016), chegaram a valores de um IC50 entre 52.92 - 136.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dependendo das condições de extração supercrítica. Existem, assim, diferenças significativas, quando comparadas com a literatura, que podem estar relacionadas com a origem e da sazonalidade da colheita da planta, para além da forma de avaliar os diferentes extratos obtidos.

Nas Figuras 25 e 26, encontra-se representado o poder de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} dos diferentes extratos de manjeriçã. Analisando a Figura 25, verifica-se que o poder redutor do Fe^{3+} a Fe^{2+} varia entre $241,16 \pm 10,49$ e $306,81 \pm 22,92$ $\mu\text{mol TEAC/g}$ extrato. O extrato metanólico do manjeriçã seco é o que apresenta melhor poder redutor $306,81 \pm 22,92$ $\mu\text{mol TEAC/g}$ extrato.

Comparando os extratos obtidos em Soxhlet do manjeriçã seco com os extratos supercríticos (Figura 26), verifica-se que o poder redutor destes é inferior. Isto pode estar relacionado com o baixo teor em polifenóis apresentado pelos extratos supercríticos (Figura 17). O menor teor de polifenóis e, conseqüente, menor capacidade no poder de redução, podem ser explicados, em parte, pela capacidade dos diferentes solventes utilizados para obter os extratos, nomeadamente a menor capacidade do CO_2 supercrítico, de extrair compostos mais polares.

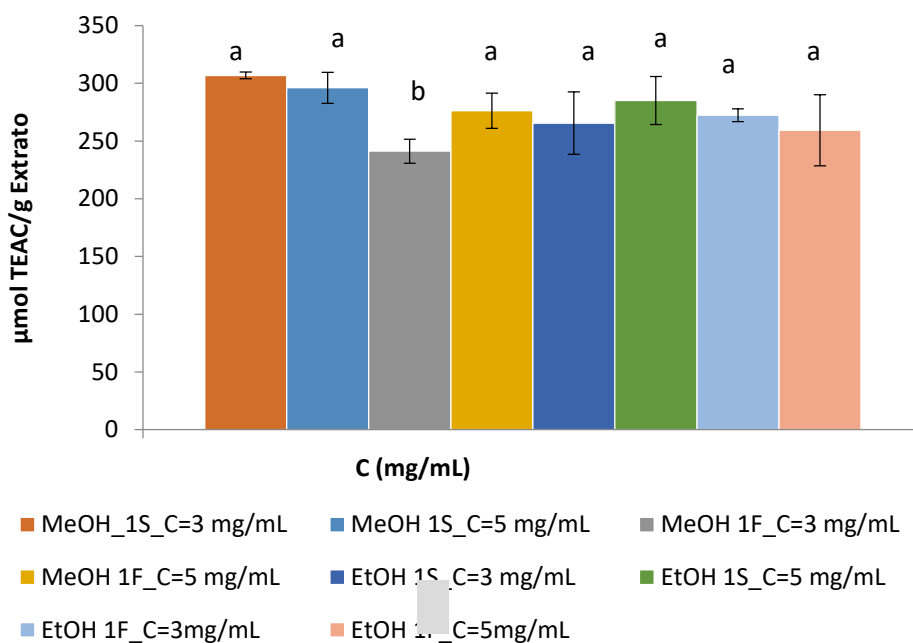


Figura 25- Poder de redução dos extratos obtidos em Soxhlet fresco e seco do manjeriçã, expressos em $\mu\text{mol TEAC/g}$ extrato. Letras iguais significam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P < 0,05$).

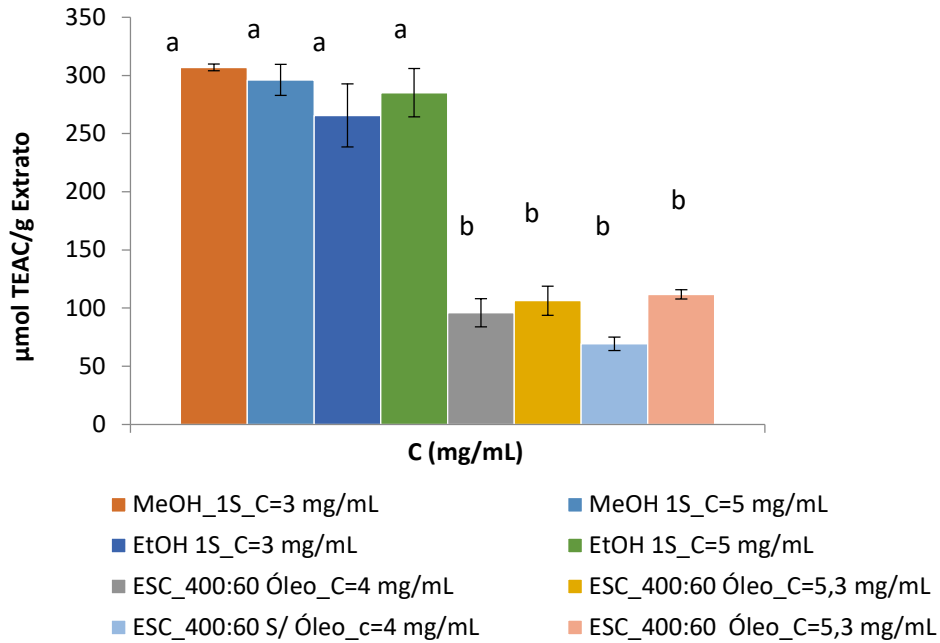


Figura 26- Comparação do poder de redução dos estratos obtidos em Soxhlet do manjeriçãõ seco com os extratos supercríticos, expressos em $\mu\text{mol TEAC/g}$ extrato. Letras iguais significam que os valores apresentam uma diferença não significativa, segundo teste de Tukey e Sheffé ($P < 0,05$).

A análise estatística efetuada nos valores médios obtidos do poder redutor dos extratos metanólico e etanólico do manjeriçãõ mostrou que, para a maioria das concentrações, a diferença dos valores não é significativa. A exceção acontece quando se compara o extrato metanólico de folhas secas para uma concentração de 3mg/mL, onde, segundo teste Tukey HSD, existe uma probabilidade de 99% destes serem diferentes e, segundo o teste Sheffé uma probabilidade de 95% de serem diferentes. O mesmo acontece, quando se compara o extrato metanólico fresco a 5 mg/mL com o extrato metanólico fresco, a uma concentração de 3 mg/mL.

V.4 – Avaliação da atividade antimicrobiana e toxicidade geral de extratos da palmeira anã e do manjeriço

V.4.1 – Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos diferentes extratos da palmeira anã e do manjeriço (obtidos por extração em Soxhlet e extração supercrítica com CO₂) foi efectuada pelo método de difusão em poços, utilizando diferentes estirpes. Testou-se em duas bactérias Gram-positivas, (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), em duas bactérias Gram-negativas (*Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922) e em duas leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 e *Candida albicans* ATCC 10231).

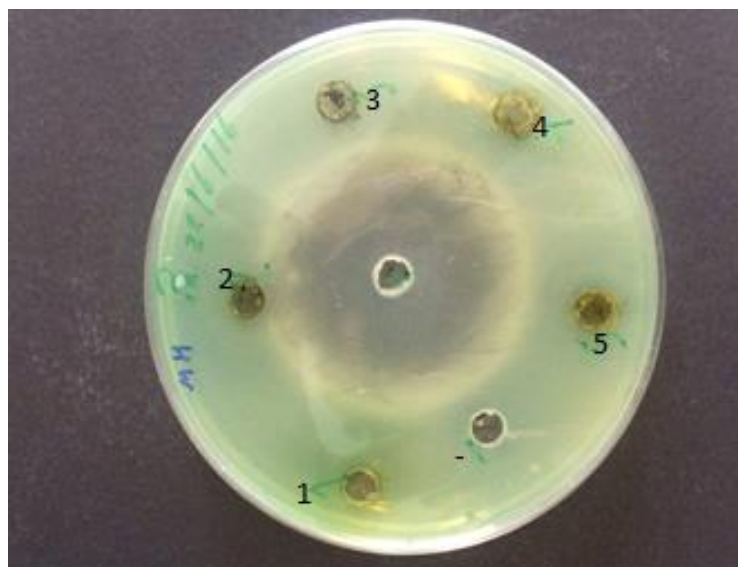


Figura 27- Efeito dos extratos de palmeira anã e de manjeriço no crescimento de *Pseudomona aeruginosa*, pelo método de difusão em poço, 24 h de incubação a 37 °C. Legenda: 1- Extrato metanólico da palmeira anã; 2- Extrato metanólico de manjeriço seco; 3- Extrato etanólico de manjeriço seco; 4- ESC CO₂ 400:60 sem óleo; 5- ESC CO₂ 400:60; controlo negativo DMSO e controlo positivo Norfloxacina.

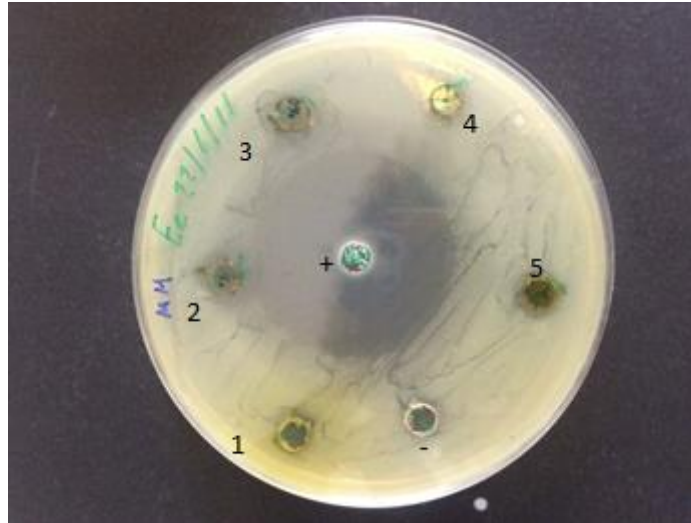


Figura 28- Efeito dos extratos de palmeira anã e manjerição no crescimento de *Escherichia coli*, pelo método de difusão em poço, 24 h de incubação a 37 °C. Legenda: 1- Extrato metanólico de palmeira anã; 2- Extrato metanólico de manjerição seco; 3- Extrato etanólico de manjerição seco; 4- ESC CO₂ 400:60 sem óleo; 5- ESC CO₂ 400:60; controlo negativo DMSO e controlo positivo Norfloxacina.

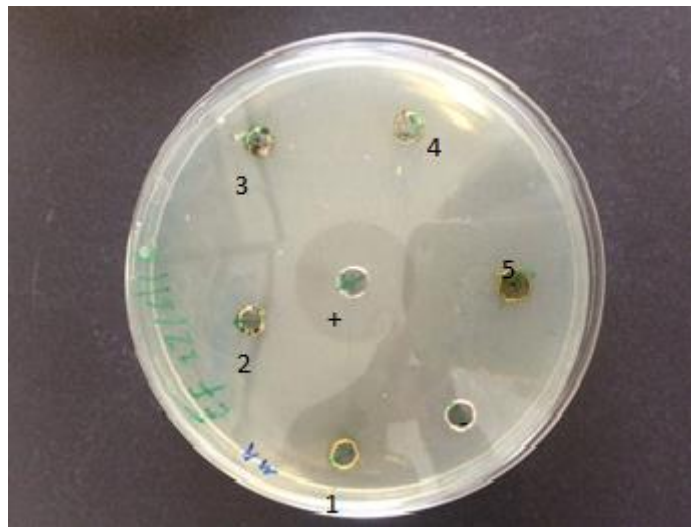


Figura 29- Efeito dos extratos de palmeira anã e manjerição no crescimento de *Enterococcus faecalis*, pelo método de difusão em poço, 24 h de incubação a 37 °C. Legenda: 1- Extrato metanólico de palmeira anã; 2- Extrato metanólico de manjerição seco; 3- Extrato etanólico de manjerição seco; 4- ESC CO₂ 400:60 sem óleo; 5- ESC CO₂ 400:60; controlo negativo DMSO e controlo positivo Vancomicina.



Figura 30- Efeito dos extratos de palmeira anã e manjericão no crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*, pelo método de difusão em poço, 24 h de incubação a 37 °C. Legenda: 1- Extrato metanólico de palmeira anã; 2- Extrato metanólico de manjericão seco; 3- Extrato etanólico de manjericão seco; 4- ESC CO₂ 400:60 sem óleo; 5- ESC CO₂ 400:60; controlo negativo DMSO, controlo positivo Vancomicina para *Staphylococcus aureus* e Nystatina para *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*.

A atividade antimicrobiana dos extratos da palmeira anã e do manjericão foi avaliada pelo método de difusão em poços na concentração de 1mg/mL e 10 mg/mL. Nenhum dos extratos mostrou atividade antibacteriana contra bactérias Gram negativas (*Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922) e Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), nem nas leveduras testadas (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 e *Candida albicans* ATCC 10231), apresentando zonas de inibição iguais às obtidas com o controlo negativo DMSO (5 mm). Considerando os resultados prévios obtidos, não foram efetuados outros testes complementares para os extratos.

V.4.2 – Toxicidade geral

O perfil de citotoxicidade dos extratos metanólicos da palmeira anã e do manjeriço foram caracterizados em linha de célula mamária humana MCF7, usando um protocolo de incubação de 24h, com o corante violeta de cristal.

Nas condições experimentais utilizadas (ver ponto IV. 4.2), os extratos de manjeriço e de palmeira anã não apresentaram citotoxicidade relevante, tendo-se observado apenas reduções de viabilidade celular muito ligeiras (<12%). Pelo contrário, o controlo positivo utilizado (DMSO 5% v/v) levou a uma redução da viabilidade celular para $26,51 \pm 1,14\%$.

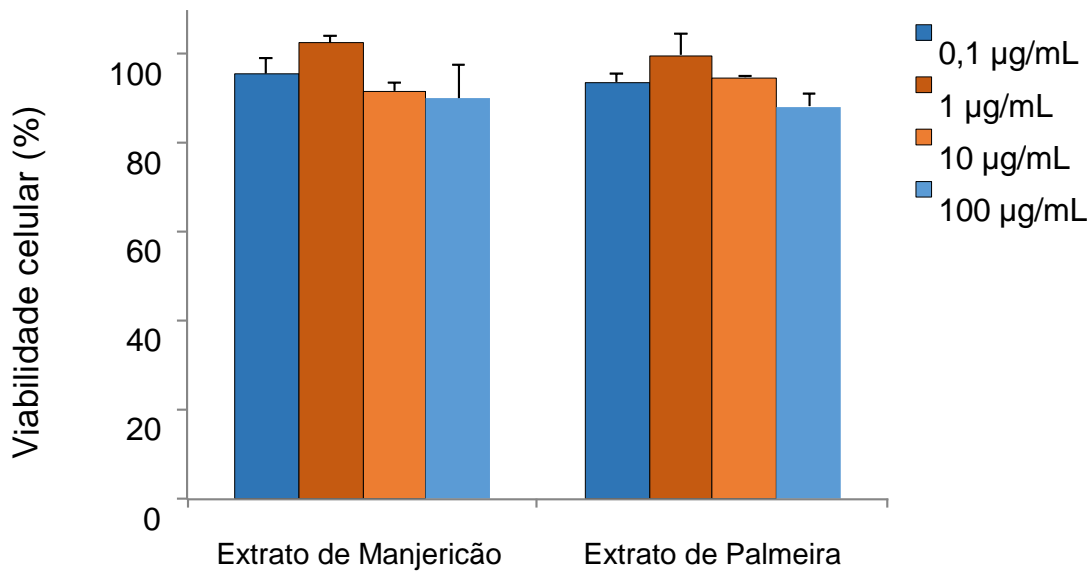


Figura 31- Viabilidade celular de culturas de células MCF7 expostas a diferentes concentrações dos extratos metanólico de manjeriço e metanólico de palmeira anã, avaliada pelo ensaio Violeta de Cristal. Os resultados (media \pm DP) são apresentados como percentagens calculadas relativamente ao controlo negativo (100%).

Assim, o ensaio *in vitro* com célula mamária humana mostrou-se adequado para avaliação da citotoxicidade, não ocorrendo uma queda significativa na viabilidade celular após 24h de cultivo ($P < 0.05$), para concentrações até 100 ppm. Este resultado é importante, pois como se sabe o manjeriço é uma erva aromática bastante utilizada na culinária, assim ficamos com uma ideia de que a sua utilização nas concentrações aqui estudadas é segura.

V.5 – Avaliação da atividade enzimática dos extratos da palmeira anã e manjeriço

V.5.1 – Inibição de acetilcolinesterase

A procura de inibidores de fontes naturais tem sido uma constante. Neste trabalho, avaliou-se a capacidade de extratos da palmeira anã e do manjeriço em inibir a AChE. Verificou-se que, comparando os resultados obtidos com um dos fármacos utilizado como inibidor de AChE, tacrina, os nossos extratos apresentam uma baixa atividade, que varia entre $3,38 \pm 0,99$ % e $7,41 \pm 0,63$ %. O extrato que apresenta melhor atividade inibitória da AChE é o extrato metanólico das folhas da palmeira anã ($7,41 \pm 0,63$ %) e, por outro lado, os que apresentam pior atividade são os extratos supercríticos, cuja inibição não é detetada nas condições de ensaio.

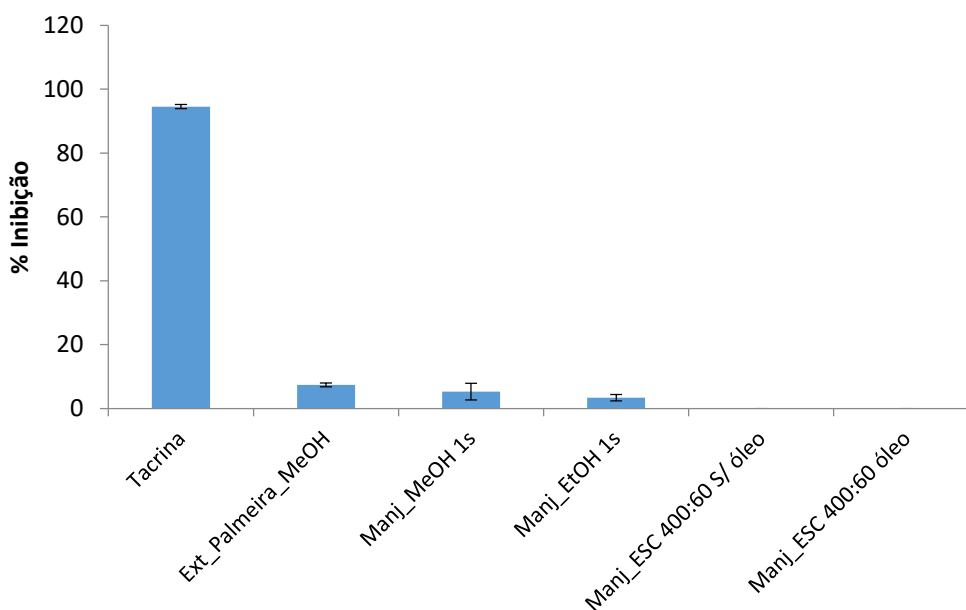


Figura 32- Resultados da inibição da AChE, de acordo com a reação de Ellman's.

Na literatura, a utilização de extratos da palmeira anã e do manjeriço como inibidores da AChE não foi ainda objeto de muita análise, de acordo com a nossa pesquisa bibliográfica. Num estudo realizado por Medronho (2015), onde se verificou o potencial de inibição da AChE, de extratos da palmeira anã do Algarve, a mesma utilizada neste trabalho, chegou-se à conclusão de que este tinha capacidade de inibir a enzima, contudo, o IC₅₀ apresentado era muito elevado, logo, a sua capacidade inibitória era fraca. Para além desse estudo, onde se verificou um elevado valor de IC₅₀, Miguel et al. (2014), ao realizarem um estudo acerca da atividade inibitória de extratos de 11 plantas medicinais, em Marrocos, incluindo a

palmeira anã, não detetaram qualquer potencial inibitório. Já para o manjeriço (Kaur, Singh, and Shri 2015), em extratos hidro-metanólico a 1µg/mL detetou-se uma atividade inibitória de 26,15±2,14%. A diferença que se verifica para os nossos extratos, está certamente relacionada com as distintas formas de extração utilizadas e com as diferentes regiões de onde provêm as plantas.

Apesar de os resultados apresentados para a inibição da AChE serem negativos, existe uma referência de uma planta pertencente à mesma família da palmeira anã (família *Areceae*), que apresenta uma boa atividade em AChE. Num estudo com plantas medicinais coreanas, determinou-se a atividade inibitória de *Acorus calamus* (*Araceae*) de 53.7±5.5 %.

V.5.2 – Inibição de tirosinase

A tirosinase, para além de estar associada a doenças degenerativas como, por exemplo, a doença de Parkinson, está envolvida no processo de melanogénese dos mamíferos. Tem sido identificado um elevado número de inibidores da tirosinase, quer de origem natural, quer de origem sintética, e a procura por esses inibidores, a partir de fontes naturais, tem sido uma constante. Neste trabalho, avaliou-se a capacidade de extratos da palmeira anã e do manjeriço em inibirem a tirosinase. O resultado é apresentado na Figura 33. O poder de inibição dos extratos estudados varia entre 3,42±1,09% (Manj_400:60 óleo) e 33,42±0,64%. (Mnj_MeOH 1S).

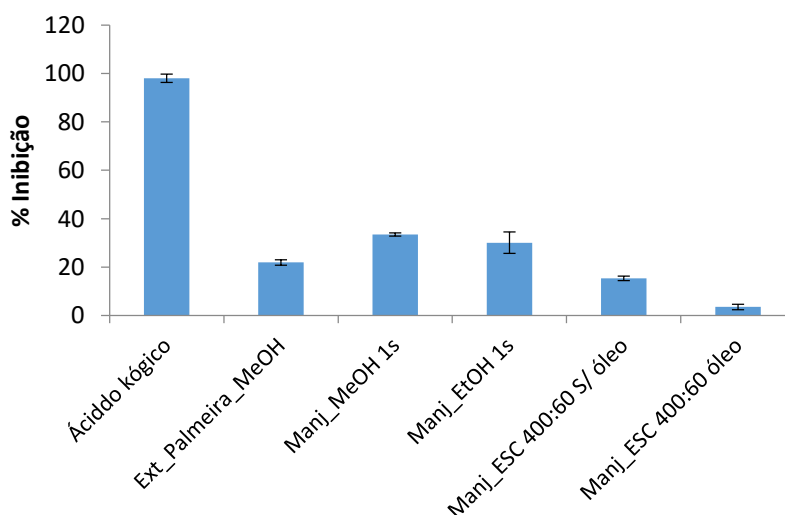


Figura 33- Resultados da inibição da TyrE.

Ao contrário do que se verifica na inibição da AChE, onde os extratos apresentam uma melhor capacidade inibitória para a tirosinase, um dos extratos apresenta valores de inibição a um terço do controlo positivo utilizado, ácido Kógico ($98,02 \pm 1,74\%$). O extrato obtido por Soxhlet, com metanol do manjeriço seco, é o que apresenta melhor atividade ($33,42 \pm 0,645$), seguido do extrato etanólico do manjeriço seco ($30,08 \pm 4,38\%$), do extrato metanólico da palmeira anã ($21,88 \pm 1,13\%$), do extrato supercrítico 400 bar e 60°C com óleo ($15,36 \pm 0,90\%$) e, finalmente, do extrato supercrítico a 400 bar e 60°C (sem óleo) com uma atividade de $3,49 \pm 1,09$.

Estudos realizados por Medronho (2015) em extratos de palmeira demonstram a mesma coerência de resultados atingidos neste estudo, onde a inibição da tirosinase por extratos foliar da palmeira anã possui um IC50 menor do que para a inibição da AChE.

V.6 – Análise por GC-MS e HPLC-MS

V.6.1 – Análise por GC-MS de óleos essenciais de manjeriço

O óleo essencial obtido é um líquido com cor levemente amarelada e um cheiro característico. O rendimento do óleo essencial de diferentes partes da planta depende do fator sazonal e da localidade. Estudos realizados por Özcan and Chalchat (2002) referem que os compostos característicos do óleo essencial de manjeriço são: linalol, eugenol, estragol, timol e *p-cimeno*.

Neste trabalho, efetuou-se a análise do óleo essencial extraído a partir da hidrodestilação de folhas de manjeriço frescas, secas e da extração supercrítica a 40°C e 90 bar.

A constituição química dos óleos essenciais do manjeriço encontra-se representada na Tabela 10. Comparando o óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas frescas (HF) com o óleo essencial obtido por hidrodestilação de folhas secas (HS), verifica-se que a sua constituição é semelhante. No óleo essencial HF identificaram-se 5 compostos em maior percentagem: metil eugenol, 34%, linalol 18%, metil chavicol 13,5% (=estragol), 1,8-cineol 7,6% e eugenol 6,9%; no óleo HS, os compostos identificados em maior percentagem foram: metil eugenol de 30,1%, linalol 18,7%, metil chavicol 19,9% (=estragol), 1,8-cineol 11% e eugenol 3,9%.

No óleo volátil obtido por extração supercrítica com CO_2 (Óleo_ESC_90_40_2º), identificaram-se os seguintes compostos em maior percentagem: metil eugenol 28,4%, metil chavicol 12,6 %, linalol 10,5 % e eugenol 6%. Comparando o óleo essencial HS com o óleo

volátil da extração supercrítica, verifica-se que estes são constituídos pelos mesmos componentes.

Tabela 10- Composição de óleos essenciais e ceras, isolados do manjeriço por hidrodestilação e ESC.

Componentes	RI	Manjeriço			
		HF	HS	Óleo_ESC_90_40_2ºS	Ceras-ESC_90_40_1ºS
α -Pinoeno	930	0,3	0,6	T	t
Canfeno	938	0,1	0,2	T	t
Sabineno	958	0,2	0,4	0,1	t
1-Octen-3-ol	961	0,2	0,2	0,1	t
1,8-Cineol	1005	7,6	11,0	3,2	t
<i>trans</i> - β -Ocimeno	1027	1,5	0,8	0,3	t
γ -Terpineno	1035	0,2	0,2	0,1	t
Linalol	1074	18,0	18,7	10,5	3,8
Cânfora	1102	0,7	0,9	0,5	t
Borneol	1134	0,6	0,6	0,4	t
Terpinen-4-ol	1148	0,3	0,4	0,1	t
α -Terpineol	1159	0,9	1,0	0,7	0,6
Metil chavicol (= estragol)	1163	13,5	19,9	12,6	4,1
Acetato de bornilo	1265	0,4	0,5	0,3	t
Eugenol	1327	6,9	3,9	6,0	5,2
<i>trans</i> -cinamato de metilo	1346	0,1	0,2	0,2	t
α -Copaeno	1375	0,1	t	0,1	t
Metil eugenol	1377	34,0	30,1	28,4	26,7
<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1434	2,8	2,4	5,6	5,1
α -Humuleno	1447	0,5	0,3	0,6	0,6
<i>trans</i> - β -Farneseno	1455	1,3	1,1	3,4	3,3
Germacreno D	1474	1,4	0,3	1,7	1,6
Bicyclogermacreno	1487	0,5	0,1	0,5	0,2
γ -Cadineno	1500	0,4	0,3	0,6	0,3
β -Sesquiphellandrene	1508	0,6	0,4	0,9	0,7
Acetato de fitol 2	2101	0,4	0,3	5,4	2,9
n-heptadecano	2700	t	0,1	0,2	1,1
n-nonadecano	2900	t	t	0,2	4,2
n-Dotriacontano	3200	t	t	0,2	13,8
Compostos identificados		97,4	98,6	85,8	85,1
Grupos de compostos					
Hidrocarbonetos monoterpénos		4,1	4,6	1,0	t
Monoterpenos contendo oxigénio		28,6	33,2	15,8	4,4
Hidrocarbonetos sesquiterpene		7,6	5,0	13,4	11,8
Sesquiterpenos contendo oxigénio		1,9	1,0	1,4	1,0
Fenilpropanoides		54,4	53,9	47,0	36,0
Outros		0,8	0,9	6,5	32,6

RI: índices de retenção, em relação aos dos n-alcenos C₈-C₂₅, t: resíduo (<0,05%),

Na Tabela 10, pode ainda verificar-se que no extrato obtido no 1.º separador, por extração supercrítica (Ceras_ESC_90_40_1º), como descrito em IV.2.3, é possível separar as ceras

do óleo volátil, nomeadamente do n-heptadecano até ao n-dotriacontano, que apresentam valores superiores no 1º separador e residuais no segundo.

Para os grandes grupos de compostos identificados, temos a presença de monoterpenos contendo oxigénio (HF 28,6 %; HS 33,2% e Óleo_ESC_80_90_2º 15,8%), fenilpropanoides (HF 54,5 %; HS 53,9% e Óleo_ESC_90_40_2º 47%) e hidrocarbonetos sesquiterpenos (HF 7,6 %; HS 5% e Óleo_ESC_90_40_2º 13,4%).

No trabalho efetuado por Zheljzkov, Callahan e Cantrell (2008), com 38 quimiotipos do *Ocimum basilicum* L, os autores identificaram diferenças muito consideráveis, quer no rendimento obtido em óleo essencial (0,072-1,92%), quer na sua composição, revelando que esta planta apresenta características específicas bastante diferentes de acordo com a região de proveniência.

Em termos de composição, os autores dividiram as plantas estudadas em sete quimiotipos, desde o grupo 1, constituído por uma elevada quantidade de linalol (19-73%), até ao grupo 7, sendo o bergamoteno o principal componente e ainda com 5 % de 1,8 cineol e <1% de linalol. De acordo com os autores, o nosso quimiotipo é identificável no grupo 4, estragol-linalol (8-29% do primeiro composto e 8-53% do segundo, respetivamente).

V.6.2 – HPLC-MS

V.6.2.1 – Caracterização da composição em compostos fenólicos da palmeira anã com HPLC-DAD-MS/MS

A determinação da composição em compostos fenólicos do extrato metanólico da palmeira anã foi efetuada por HPLC-DAD-MS/MS, com base no tempo de retenção dos compostos, espectros de UV/Vis, espectros de massa e com recurso a fragmentos padrão de MS-MS.

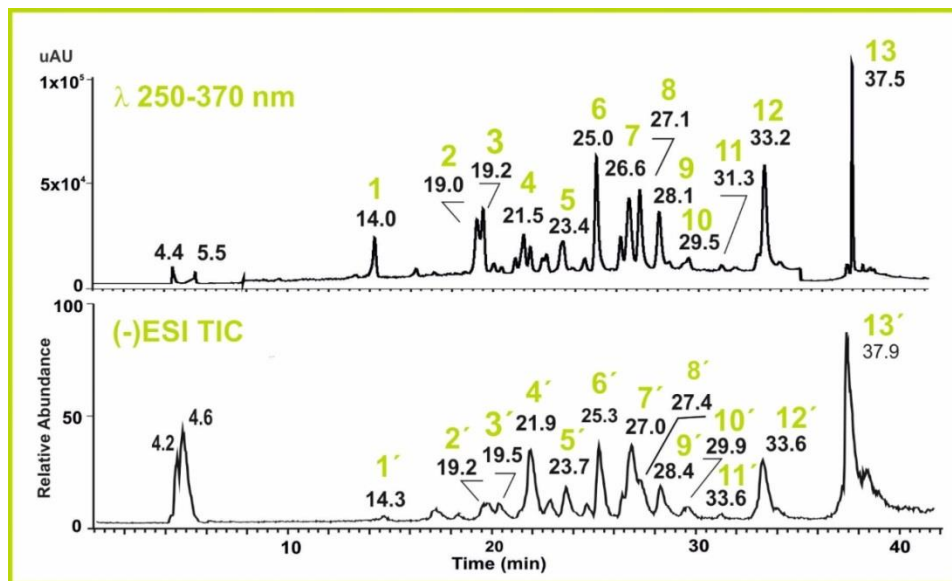


Figura 34- Espectro de HPLC-DAD-MS/MS obtido para o extrato metanólico das folhas da palmeira anã.

A amostra foi analisada no detetor DAD para alguns comprimentos de onda onde há maior absorção de energia para os compostos fenólicos. O cromatograma da Figura 34 mostra perfis cromatográficos entre 250-370nm, sendo os comprimentos de onda mais baixos para os compostos fenólicos totais e os ácidos fenólicos hidroxibenzoicos (≈ 254 nm); a 320nm para os ácidos fenólicos hidroxicinâmicos e a 360nm para flavonóides, entre outros.

Por outro lado, a cromatografia líquida associada à espectrometria de massa é, muitas vezes, utilizada para identificação e quantificação de compostos presentes em amostras complexas. Inicialmente, fez-se um varrimento de valores de massa (m/z) entre 100-1000 Da para se obter um conhecimento geral dos compostos presentes na amostra. Em seguida, fez-se uma pesquisa de alguns iões moleculares específicos reportados na literatura. Analisando os espectros apresentados na Figura 34, foi possível verificar que o extrato metanólico das folhas da palmeira anã é constituído, maioritariamente, por derivados de C- e O- luteolinas (flavonóides).

Nas Figuras 35 e 36 é apresentado em detalhe o estudo para os picos 9 e 13, como compostos representativos nesta identificação. O pico 9, com o íão m/z 447 $[M-H]^-$ apresenta no MS-MS os íões m/z 327 e 357 característicos da fragmentação de compostos C-glicósidos, tendo sido possível a sua identificação por comparação com um padrão, como a orientina.

O pico 13, com o íão m/z 637 $[M-H]^-$ apresenta no MS-MS o íão m/z 329 característico da fragmentação de compostos O- luteolinas. Recorrendo-se a dados da literatura (Gaamoussi, Israili, and Lyoussi, 2010), foi possível identificá-lo como tircina-7-O-neohesperidosido. Apesar de os extratos da palmeira anã ainda não se encontrarem muito estudados, autores como Willians and Harbone (1973) apresentaram um estudo onde se identificou, no extrato de folhas da palmeira anã, a presença de C- e O- flavonóides, nomeadamente o C-glicósido e tircina 5-O-glicósido.

Na Tabela 11 encontra-se o resumo dos compostos referentes aos picos que foram estudados, com os respetivos íões $[M-H]^-$ e consequentes íões m/z , a partir dos quais foi possível a sua identificação.

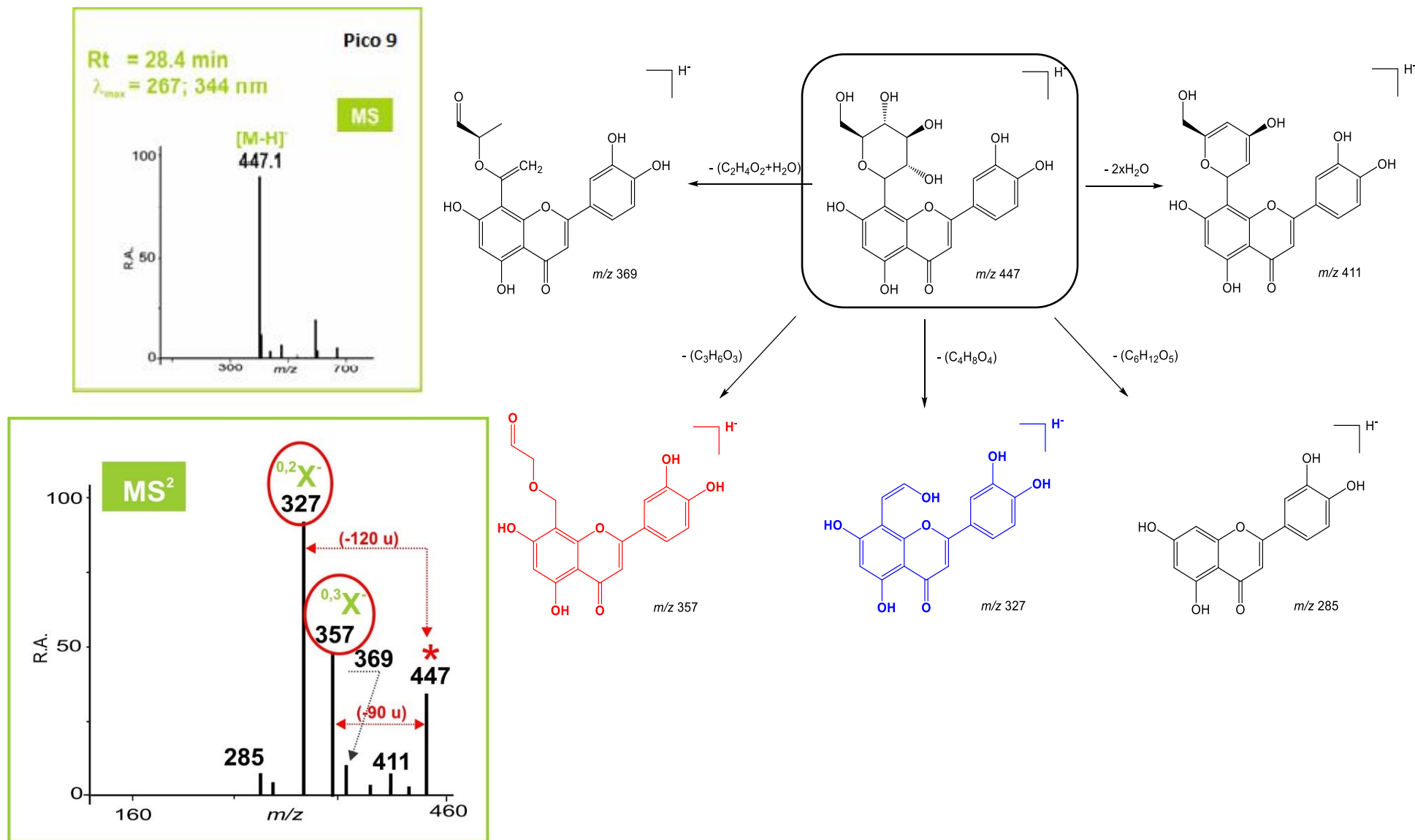


Figura 35- Identificação do pico 9, orientina (luteolina-8-C-glicósido).

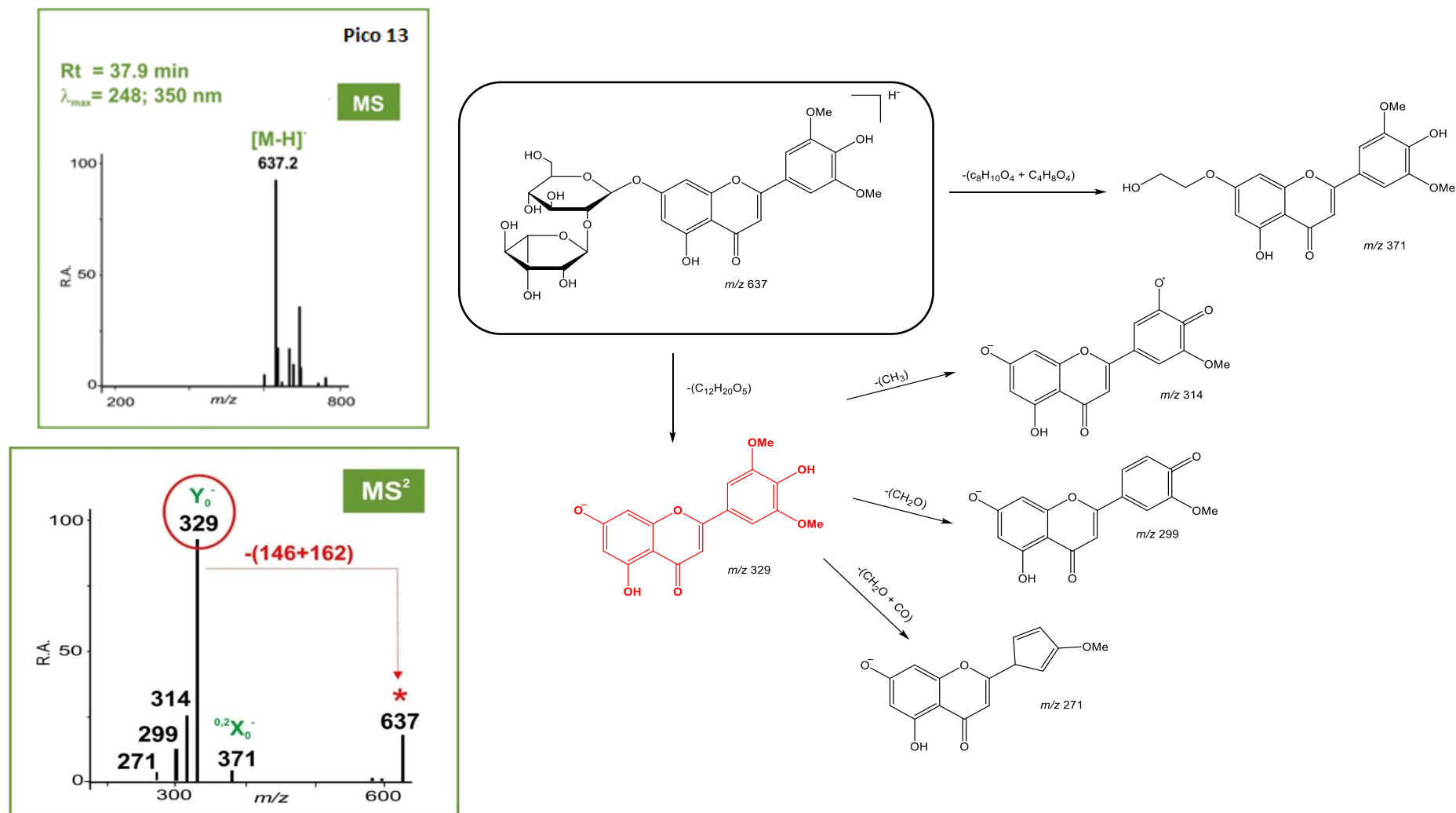
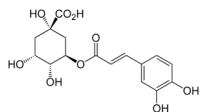
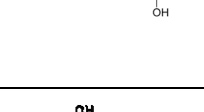
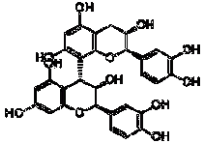
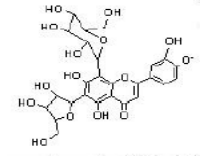
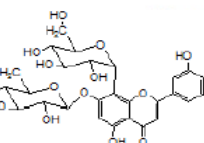
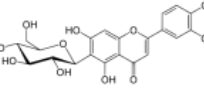
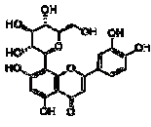
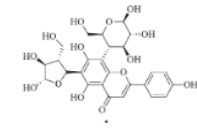
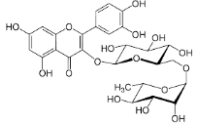
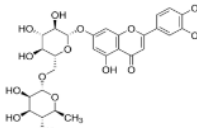
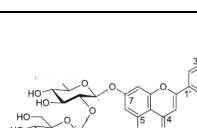


Figura 36- Identificação do pico 13, tricina-7-O-neohesperidosido.

Tabela 11- Quadro de resumo dos 13 compostos identificados por HPLC-DAD-MS/MS.

Pico	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	Estrutura	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z, %, lão atribuído)	Composto atribuído
1	14,4	238; 324		353	MS ² [353]:191(100) [M-H-152] ⁻ ; 179 (60); 132 (20)	Ácido 3-cafeoilquinico
2	19,2	242; 324		353	MS ² [353]:191(100) [M-H-152] ⁻ ; 179 (60);163 (60) 135 (10)	Ácido 5-cafeoilquinico
3	19,5	304		577	MS ² [577]:559(2); 451 (40); 425 (100); 407 (60); 299(2); 289 (5) [Cat] ⁻	Procianidina B1
4	21,9	306		577	MS ² [577]:559 (5); 451 (30); 425 (100); 407 (50); 289 (10) [Cat] ⁻	Procianidina B2
5	23,7	260; 347		579	MS ² [579]:561(5); 519 (10) [M-H-60] ⁻ ; 489 (90) [M-H-90] ⁻ ; 459 (100) [M-H-120] ⁻ ; 369 (20);	Isomero da Luteolina-6-C –pentosil-8-C- glucopiranosido
6	25,3	270; 348		609	MS ² [609]:591(3); 439 (100) [M-H-120] ⁻ ; 429 (50) [M-H-180] ⁻ ; 369 (25) [M-H-252] ⁻ ; 327 (5); 283 (3)	Luteolina-7-O – glucopiranosil -8-C - glucopiranosido
7	27,0	268; 344		609	MS ² [609]: 489(65); 429 (60); 357 (85); 327 (100) [M-H-162-120] ⁻ ; 309 (20); 285 (2)	Derivado de Luteolina- di- glicósido
8	27,4	270; 346		447	MS ² [442]: 429(15); 357 (85) [M-H-90] ⁻ ; 327 (100) [M-H-120] ⁻ ; 285 (3)	Isorientina

Continuação da Tabela 11

9	28,4	266; 344		447	MS ² [447]: 411(3); 369 (10); 357 (65) [M-H-120] ⁻ ; 327 (100) [M-H-120] ⁻ ; 285 (5)	Orientina
10	29,9	270; 324		593	MS ² [593]: 503(30) [M-H-90] ⁻ ; 473 (100) [M-H-120] ⁻ ; 383 (10) [M-H-120-90] ⁻ ; 353 (4) [M-H-2x120] ⁻ ;	Apigenina-6-8-C glicosido
11	31,8	254; 354		609	MS ² [609]: 463 (2) [M-H-162] ⁻ (Y ₁ ⁻); 301 (100) [M-H-308] ⁻ (Y ₀ ⁻); 300 (80) (Y ₀ ⁻ H);	Quercetina-3-O Rutinosido (Rutina)
12	33,6	256; 348		593	MS ² [593]: 447 (3) [M-H-146] ⁻ (Y ₁ ⁻); 327 (5); 285 (100) [M-H-308] ⁻ (Y ₀ ⁻);	Luteolina-7-O-rutinosido
13	37,9	248; 350		637	MS ² [627]: 371 (3); 329(100) (Y ₀ ⁻); 314 (25); 299 (10); 271 (4);	Tricina-7-O-neohesperidósido

Rt- Tempo de retenção; [M-H]⁻ - molécula com menos um H; m/z – massa/carga; ESI-MS/MS – Espectrometria de massa com ionização de electrospray.

VI – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A eficácia da extração das folhas da palmeira anã e do manjeriço mostrou-se dependente da técnica de extração aplicada, do solvente utilizado e da sua polaridade.

A validação intralaboratorial da utilização da técnica convencional e da de microplaca permitiu concluir que quanto à análise efetuada por estes dois métodos a diferentes comprimentos de ondas, os resultados apresentam diferenças estatisticamente significativas; contudo, para as concentrações de 0,9 mg/mL tal não se verificou. A utilização de técnicas de microplaca mostrou-se viável e com resultados mais coerentes e consistentes, quando comparada com a utilização da técnica convencional para baixas concentrações.

O extrato da palmeira anã demonstrou possuir uma boa capacidade antioxidante, e isto deve-se ao elevado teor de polifenóis e flavonóides que apresenta. Já os extratos do manjeriço apresentam uma menor atividade antioxidante, em consequência do baixo teor de polifenóis e flavonóides que apresentam. Tanto os extratos da palmeira como os do manjeriço apresentaram uma boa capacidade de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} .

A capacidade antimicrobiana, a inibição enzimática e a avaliação da toxicidade geral dos extratos da palmeira e do manjeriço permitiram-nos concluir que nenhum dos extratos apresentava atividade antimicrobiana relevante nas condições estudadas, e não demonstraram ser tóxicos (extrato metanólico da palmeira e manjeriço seco), viabilizando a sua utilização como potenciais nutracêuticos.

Para a inibição enzimática, foram testadas duas das enzimas (AChE e TyrE) relacionadas em problemas de saúde de grande preocupação na sociedade, como a demência e as doenças de pele. Os extratos apresentaram uma baixa atividade para a inibição da AChE, Já para a inibição da TyrE, os extratos metanólico e etanólico do manjeriço seco e metanólico da palmeira apresentaram melhores actividades: $33,42 \pm 0,64$; $30,08 \pm 4,38$ e $21,88 \pm 1,13$, respetivamente.

A caracterização por GC-MS do óleo essencial e do óleo volátil das folhas de manjeriço fresca e seca, permitiu concluir que estes são constituídos pelos mesmos compostos, mas em percentagens com pequenas diferenças. Os compostos maioritários identificados por GC-MS são: 1,8-cineol, linalol, metil chavicol, metil eugenol e eugenol. Foi possível a classificação da planta, de acordo com a literatura, com o quimiotipo do grupo 4, estragol-linalol, com valores entre 10,5-18,7% e 12,6-19,9%, respetivamente.

O extrato da palmeira anã foi caracterizado por HPLC-DAD-MS/MS, permitindo concluir que o extrato metanólico das folhas da palmeira é constituído, preferencialmente, por derivados de C- e O- luteolinas (flavonóides). A orientina (luteolina-8-C-glicósido) e a tricina-7-O-neohesperidosido são dois dos exemplos de compostos identificados, num total de 13 compostos.

Para estudos futuros, será importante avaliar a influência da extração fracionada do óleo volátil na atividade antioxidante do extrato sem os componentes voláteis. Ainda para os extratos de manjeriço, a utilização de HPLC-MS para a identificação dos compostos não foi completada e apresentou algumas dificuldades, devido ao baixo teor de flavonóides, originando picos pequenos, que dificultaram a sua identificação.

Uma breve análise dos resultados até agora obtidos, no HPLC-DAD, permitiu identificar potenciais componentes nos extratos de metanol e etanol, como o hiperóxido, ácido 3-cafeoilquino, isomero da Luteolina-6-C –pentosil-8-C- glucopiranosido, um derivado de luteolina- di- glicósido e a tricina-7-O- neohesperidósido. Contudo, estes resultados não foram ainda confirmados por MS ou MS-MS, e os extratos de ESC apresentam uma maior dificuldade de interpretação, devido a uma enorme sobreposição de bandas no detetor de DAD. Assim, a utilização de GC-MS para a análise destes extratos poderá ser uma solução alternativa.

Em relação à palmeira anã, seria interessante efetuar-se um estudo futuro sobre os frutos, pois, segundo a literatura, os extratos das sementes da palmeira anã apresentam uma atividade antioxidante superior à do extrato foliar verificado neste trabalho.

VII – BIBLIOGRAFIA

- A.Ahmed, Shimaa, Hossam M. Hassan, Sayed A. Ahmed¹, and Ahmed H. Elghandour. 2015. "Comparative Investigation of Minerals, Amino Acids, Lipoidal Contents and General Analysis of *Chamaerops Humilis* L. Organs Growing in Egypt." *Journal of American Science* 11(9): 94–100.
- A.K Pandey, and S. Kumar. 2013. "Perspective on Plant Products as Antimicrobial Agentes: A Review." *Pharmacologia* 4(7): 469–80.
- Ajila, C M et al. 2011. "Extraction and Analysis of Polyphenols : Recent Trends." *Critical Reviews in Biotechnology* 31(3): 227–49.
- Allali, H. et al. 2008. "Phytotherapy of Diabetes in West Algeria." *Asian Journal of Chemistry* 20(4): 2701–10.
- Apak, Reşat et al. 2013. "Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity / Activity (IUPAC Technical Report)." *Pure and Applied Chemistry* 85(5): 957–98.
- Avanmardi, Jamal et al. 2002. "Chemical Characterization of Basil (*Ocimum Basilicum* L .) Found in Local Accessions and Used in Traditional Medicines in Iran." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5878–83.
- Azmir, J et al. 2013. "Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials : A Review." *Journal of Food Engineering* 117: 426–36.
- Balouiri, Mounyr, Moulay Sadiki, and Saad Koraichi Ibsouda. 2016. "Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity : A Review." *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6: 71–79.
- Balunas, Marcy J, and A. Douglas Kinghorn. 2005. "Drug Discovery from Medicinal Plants." *Life Sciences* 78: 431–41.
- Barbalho, Sandra Maria et al. 2012. "Sweet Basil (*Ocimum Basilicum*): Much More than a Condiment." *TANG [HUMANITAS MEDICINE]* 2(1): 1–5.
- Beghalia, M. et al. 2008. "Inhibition of Calcium Oxalate Monohydrate Crystal Growth Using Algerian Medicinal Plants." *Journal of Medicinal Plants Research* 2(3): 66–70.
- Bellakhdar, J., R. Claisse, J. Fleurentain, and C. Younos. 1991. "Repertory of Standard

- Herbal Drugs in the Moroccan Pharmacopoeia." *Journal of Ethnopharmacology* 35: 123–43.
- Benmehdi, H., O. Hasnaoui, O. Benali, and F. Salhi. 2012. "Phytochemical Investigation of Leaves and Fruits Extracts of *Chamaerops Humilis* L ." *Journal of Materials and Environmental Science* 3(2): 320–27.
- Bobo-García, Gloria et al. 2015. "Intra-Laboratory Validation of Microplate Methods for Total Phenolic Content and Antioxidant Activity on Polyphenolic Extracts, and Comparison with Conventional Spectrophotometric Methods." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95: 204–9.
- Bonev, Boyan, and James Hooper. 2008. "Principles of Assessing Bacterial Susceptibility to Antibiotics Using the Agar Diffusion Method." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61: 1295–1301.
- Ch, M. A. et al. 2015. "Biological and Pharmacological Properties of the Sweet Basil (*Ocimum Basilicum*)." *British Journal of Pharmaceutical Research* 7(5): 330–39.
- Chang, Chen-tien et al. 2013. "Chemical Composition and Tyrosinase Inhibitory Activity of *Cinnamomum Cassia* Essential Oil." *Botanical Studies* 54(10): 1–7.
- Chang, Te-sheng. 2009. "An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors." *International Journal of Molecular Sciences* 10: 2440–75.
- Chang, Tsong-Min. 2012. "Biotransformation Tyrosinase and Tyrosinase Inhibitors." *Journal of Biocatalysis & Biotransformation*: 1–2.
- Chung, Y . et al. 2002. "Antioxidative Activity and Safety of the 50 % Ethanolic Extract from Red Bean Fermented by *Bacillus Subtilis* IMR-NK1." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2454–58.
- Coelho, J. et al. 2007. "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Volatiles from *Satureja Fruticosa* Béguinot." *Flavour Fragrance Journal* 22: 438–42.
- Coelho, J. et. al. 2012. "Extraction of Volatile Oil from Aromatic Plants with Supercritical Carbon Dioxide: Experiments and Modeling." *Molecules* 17: 10550–73.
- Coelho, J., and A. Palavra. 2015. "Supercritical Fluid Extraction of Coumpounds from Spices and Herbs." In *High Pressure Fluid Technology for Green Food Processing*, eds. Tiziana Fornari and Roumiana P. Stateva. Switzerland: Springer, 357–96.

- Coelho, J., A. Pereira, R. L. Mendes, and A. M. Palavra. 2003. "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of *Foeniculum Vulgare* Volatile Oil." *Flavour Fragrance Journal* 18: 316–19.
- Colovic, M. B. et al. 2013. "Acetylcholinesterase Inhibitors : Pharmacology and Toxicology." *Current Neuropharmacology* 11: 315–35.
- Copeland, Robert A. 2000. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*. 2^o ed. ed. Wiley. New York/Chichester/Weinheim/Brisbane/Singapore/Toronto.
- Dai, J., and R. J. Mumper. 2010. "Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties." *Molecules* 15: 7313–52.
- Dai, Jin, and Russell J Mumper. 2010. "Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties." : 7313–52.
- Dev, N, A K Das, M A Hossain, and S M M Rahman. 2011. "Chemical Compositions of Different Extracts of *Ocimum Basilicum* Leaves." *Journal of Scientific Research* 3(1): 197–206.
- Djeridane, A. et al. 2006. "Food Chemistry Antioxidant Activity of Some Algerian Medicinal Plants Extracts Containing Phenolic Compounds." *Food Chemistry* 97: 654–60.
- Dorman, H. J. D., A. Peltoketo, R. Hiltunen, and M. J. Tikkanen. 2003. "Characterisation of the Antioxidant Properties of de-Odourised Aqueous Extracts from Selected Lamiaceae Herbs." *Food Chemistry* 83: 255–62.
- El-Azim, Mohamed H. M. Abd et al. 2015. "Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Egyptian *Ocimum*." *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences* 2(4): 837–42.
- El-soud, N. H. A., M. Deabes, L. A. El-kassem, and M. Khalil. 2015. "Chemical Composition and Antifungal Activity of *Ocimum Basilicum* L . Essential Oil." *Journal of Medical Sciences* 3(3): 374–79.
- Fabricant, Daniel S, and Norman R Farnsworth. 2001. "The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery." *Environmental Health Perspectives* 109: 69–75.
- Fernandes, A. et al. 2010. "Oxidative Injury in V79 Chinese Hamster Cells : Protective Role of the Superoxide Dismutase Mimetic MnTM-4-PyP." *Cell Biol Toxicol* 26: 91–101.

- Fernandes, A. et al. 2012. "Development of Pyridine-Containing Macrocyclic Copper (II) Complexes : Potential Role in the Redox Modulation of Oxaliplatin Toxicity in Human Breast Cells." *Free Radical Research* 46(9): 1157–66.
- Ferreira, A., C. Proenc, M. L. M. Serralheiro, and M. E. M. Araújo. 2006. "The in Vitro Screening for Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity of Medicinal Plants from Portugal." *Journal of Ethnopharmacology* 108: 31–37.
- Filip, S. et al. 2016. "Chemical Composition and Antioxidant Properties of Ocimum Basilicum L. Extracts Obtained by Supercritical Carbon Dioxide Extraction: Drug Exhausting Method." *The Journal of Supercritical Fluids* 109: 20–25. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844615301790>.
- Gaamoussi, F., Zafar H. Israili, and Badia Lyoussi. 2010. "Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of an Aqueous Extract of Chamaerops Humilis Leaves in Obese , Hyperglycemic and Hyperlipidemic Meriones Shawi Rats." *Pakistan Journal of Chemistry* 23(2): 212–19.
- Gurib-fakim, Ameenah. 2006. "Medicinal Plants : Traditions of Yesterday and Drugs of Tomorrow." *Molecular Aspects of Medicine* 27: 1–93.
- Hasnaoui, O., O. Benali, M. Bouazza, and H. Benmehdi. 2013. "Ethnobotanical Approaches and Phytochemical Analysis of Chamaerops Humilis L . (Areaceae) in the Area of Tlemcen (Western Algeria)." *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 4(2): 910–18.
- Hassan, S. M., A. A. Al Aqil, and M. Ttimarad. 2013. "Determination of Crude Saponin and Total Flavonoids Content in Guar Meal." *Advancement in Medicinal Plant Research* 1(1): 24–28.
- Hemalatha, M. et al. 2013. "A Review on Antimicrobial Efficacy of Some Traditional Medicinal Plants in Tamilnadu." *Journal of Acute Disease*: 99–105.
- Ibañez, E., M. Herrero, J. A. Mendiola, and M. Castro-puyana. 2012. "Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources : Macro and Micro Algae , Cyanobacteria , and Invertebrates Bioactive Compounds from Marine Sources." In *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*, ed. M. Hayes. , 55–98.
- Ijaz, A. et al. 2008. "Chemical Composition , Antioxidant and Antimicrobial Activities of Basil (

- Ocimum Basilicum) Essential Oils Depends on Seasonal Variations.” *Food Chemistry* 108: 986–95.
- Ismail, M. 2006. “Central Properties and Chemical Composition of Ocimum Basilicum Essential Oil.” *Pharmaceutical Biology* 44(8): 619–26.
- Jaszek, M. et al. 2013. “New Bioactive Fungal Molecules with High Antioxidant and Antimicrobial Capacity Isolated from *Cerrena Unicolor* Idiophasic Cultures.” *BioMed Research International* 2013: 1–11.
- Karimi, Ehsan, and Hawa Z. E. Jaafar. 2011. “HPLC and GC-MS Determination of Bioactive Compounds in Microwave Obtained Extracts of Three Varieties of *Labisia Pumila* Benth.” *Molecules* 16: 6791–6805.
- Kaur, Sanimardeep, Varinder Singh, and Richa Shri. 2015. “In Vitro Evaluation of Acetylcholinesterase Inhibition by Standardized Extracts of Selected Plants.” *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research* 6(4): 247–50.
- Khair-ul-Bariyah, S., D. Ahmed, and M. Ikram. 2012. “Ocimum Basilicum: A Review on Phytochemical and Pharmacological Studies.” *Pakistan Journal of Chemistry* 2(2): 78–85.
- Khoudali, S, A Essaqui, and A Dari. 2016. “Study of the Chemical Composition of the Essential Oil of Leaves of the Dwarfish Palm Tree (*Chamaerops Humilis* L .) of Morocco Outside the Blooming Season.” *Journal of Materials and Environmental Science* 7(6): 2155–60.
- Kicman, Andrew T, Mark C Parkin, and Ray K Iles. 2007. “An Introduction to Mass Spectrometry Based Proteomics — Detection and Characterization of Gonadotropins and Related Molecules.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 260-262: 212–27.
- Li, W. J. et al. 2012. “Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of *Liriope Muscari*.” *Molecules* 17: 1797–1808.
- Marwat, S. K. et al. 2011. “Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of Sweet Basil- *Ocimum Basilicum* L . (*Lamiaceae*).” *Asian Journal of Chemistry* 23(9): 3773–82.
- Mechergui, Kaouther et al. 2010. “Essential Oils of *Origanum Vulgare* L. Subsp. *Glandulosum* (Desf.) Ietswaart from Tunisia: Chemical Composition and Antioxidant

- Activity." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(10): 1745–49.
- Medronho, Joana Cristina Pereira. 2015. "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E TEOR EM FENÓIS DE DIFERENTES EXTRATOS DE PALMEIRA ANÃ (CHAMAEROPS HUMILIS L.)." Universidade do Algarve.
- Melro, M. E., M. M. Alemán, J. Cabello, and J. Peñas. 1993. "On the Mediterranean Fan Palm." *Principles* 37(3): 151–58.
- Miguel, M., N. Bouchmaaa, S. Aazza, and F. Gaamoussi. 2014. "Antioxidant , Anti-Inflammatory and Anti-Acetylcholinesterase Activities of Eleven Extracts of Moroccan Plants." *Fresenius Environmental Bulletin* 23(6): 1–14.
- Mukherjee, P. K., V. Kumar, M. Mal, and P. J. Houghton. 2007. "Acetylcholinesterase Inhibitors from Plants." *Phytomedicine* 14: 289–300.
- Occhipinti, A. et al. 2013. "Comparative Analysis of Supercritical CO₂ Extracts and Essential Oils from an *Ocimum Basilicum* Chemotype Particularly Rich in T-Cadinol." *The Journal of Essential Oil Research* 25(4): 272–77.
- Okigbo, R. N., C. L. Anuagasi, and J. E. Amadi. 2009. "Advances in Selected Medicinal and Aromatic Plants Indigenous to Africa." *Journal of Medicinal Plants Research* 3(2): 86–95.
- Özcan, M., and J.-C. Chalchat. 2002. "Essential Oil Composition of *Ocimum Basilicum* L. and *Ocimum Minimum* L. in Turkey." *Czech J. Food Sci.* 20(6): 223–28.
- Pereira, M., D. Matias, F. Pereira, and C. P. Reis. 2015. "Antimicrobial Screening of *Plectranthus Madagascariensis* and *P. Neochilus* Extracts." *Biomedical Biopharmaceutical Research* 1(12): 127–38.
- Pisoschi, A. M., and G. P. Negulescu. 2011. "Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review." *Biochemistry and Analytical Biochemistry* 1(1): 1–10.
- Politeo, O, M Jukic, and M Milos. 2007. "Food Chemistry Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Free Volatile Aglycones from Basil (*Ocimum Basilicum* L.) Compared with Its Essential Oil." *Food Chemistry* 101: 379–85.
- Prior, R. L., X. Wu, and K. Schaich. 2005. "Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4290–4302.

-
- Quintas, Alexandre, Ana Ponces Freire, and Manuel J. Halpern. 2008. *Bioquímica Organização Molecular Da Vida*. ed. Lidel. Lisboa-Porto: Lidel.
- Reis, Filipa S. et al. 2011. "Biomolecule Profiles in Inedible Wild Mushrooms with Antioxidant Value." *Molecules* 16: 4328–38.
- Saïd, K., E. Abdelhak, M. Haidoune, and M. Benaïssa. 2013. "Chemical Composition of the Essential Oil Extracted from the Leaves of the Dwarfish (*Chamaerops Humilis* L .) Palm Tree of Morocco (Region of Benslimane)." *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 3(08): 113–15.
- Shi, J. et al. 2005. "Extraction of Polyphenolics from Plant Material for Functional Foods — Engineering and Technology." *Food Reviews International* 21: 139–66.
- Shrivastava, Al., and V. B. Gupta. 2011. "Methods for the Determination of Limit of Detection and Limit of Quantitation of the Analytical Methods." *Chronicles of Young Scientists* 2(1): 21–25.
- Singleton, V. L., J. A. Rossi, and JR. 1965. "Colorimetry of Total Phenolics With Phosphomolybic-Phosphotungstic Acid Reagents." *Phenolics Determination*: 144–48.
- Thaipong, K. et al. 2006. "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC Assays for Estimating Antioxidant Activity from Guava Fruit Extracts." *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 669–75.
- Vardhan, A., S. Khan, and B. Pandey. 2014. "Screening of Plant Parts for Anti-Tyrosinase Activity by Tyrosinase Assay Using Mushroom Tyrosinase." *Indian Journal of Scientific Research* 4(1): 134–39.
- Vlase, L. et al. 2014. "Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities and Phenolic Profile for *Hyssopus Officinalis*, *Ocimum Basilicum* and *Teucrium Chamaedrys*." *Molecules* 19: 5490–5507.
- Voet, Donald, and Judith G. Voet. 1995. *Biochemistry*. 2^o ed. ed. John Wiley & Sons. New York.
- Willians, C. A., and J.B. Harbone. 1973. "Negatively Charged Flavones and Tricin as Chemosystematic Markers in the Palmae." *Phytochemistry* 12: 2417–30.
- Yen, Gow-chin, Hui-yin Chen, and Food Science. 1995. "Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity." *Journal of Agricultural and Food*

Chemistry 43: 27–32.

- Yener, M. Ersan. 2015. "Supercritical Fluid Processing for The Recovery of Bioactive Compounds from Food Industry By-Products." In *High Pressure Fluid Technology For Green Food Processing*, eds. Tiziana Fornari and Roumiana P. Stateva. Switzerland: Springer, 305–55.
- Yy, Chan, Kim Kh, Cheah Sh, and Chan Ying Ying. 2011. "Optimization and Validation of a Cell-Based Tyrosinase Assay for Screening of Tyrosinase Inhibitors." *Journal of Health and Translational Medicine* 14(2): 1–4.
- Zeković, Z. et al. 2014. "Mathematical Modeling of Ocimum Basilicum L. Supercritical CO₂ Extraction." *Chemical Engineering & Technology* 37(12): 2123–28.
- Zheljazkov, V. D., A. Callahan, and C. L. Cantrell. 2008. "Yield and Oil Composition of 38 Basil (Ocimum Basilicum L .) Accessions Grown in Mississippi." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 241–45.
- Zheljazkov, V.D. et al. 2008. "Yield and Composition of Ocimum Basilicum L . and Ocimum Sanctum L . Grown at Four Locations." *Hort Science* 43(3): 737–41.

VIII – ANEXOS

Anexo A - Curva de calibração de ácido gálico, para a determinação do teor em polifenóis pelo método convencional a 765 nm.

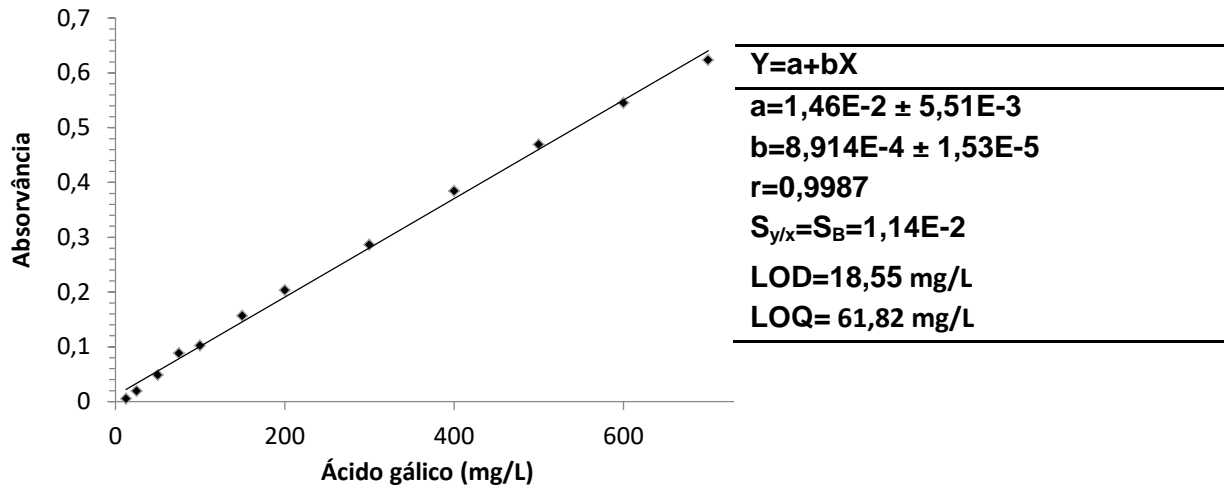


Figura 37- Curva de calibração do ácido gálico usado na determinação do teor de polifenóis.

Anexo B - Curva de calibração de ácido gálico, para a determinação do teor em polifenóis pelo método de microplaca a 655 nm.

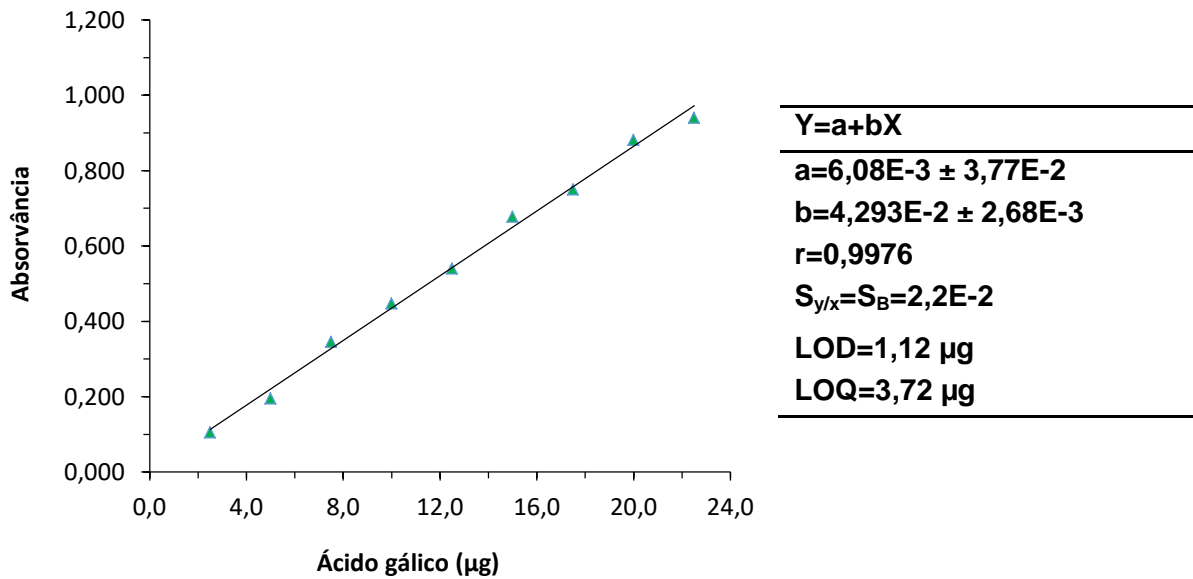


Figura 38- Curva de calibração de ácido gálico, utilizado na determinação de teor de polifenóis pelo método de microplaca.

Anexo C - Curva de calibração da catequina, para a determinação do teor de flavonóides a 510 nm.

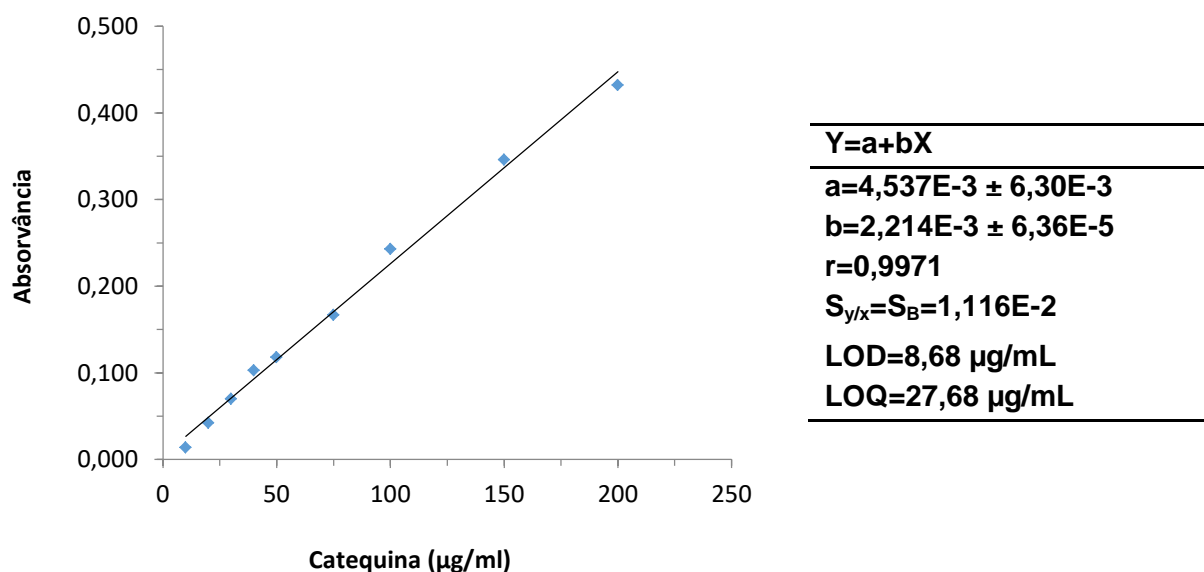


Figura 39- Curva de calibração da catequina para a determinação do teor em flavonóides.

Anexo D - Curva de calibração de trolox, para a determinação do teor do poder de redução do Fe³⁺ a 655 nm.

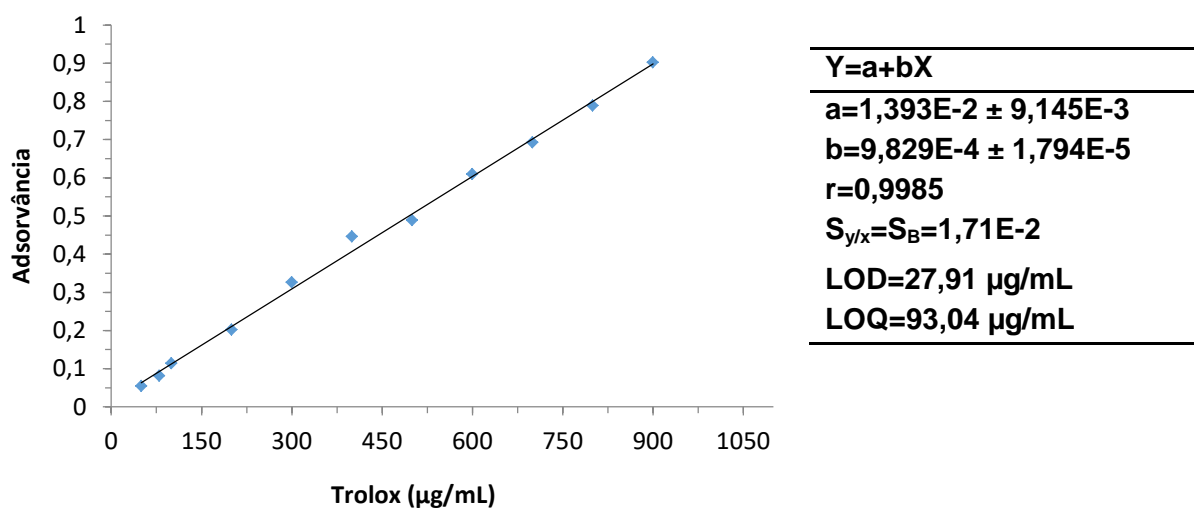


Figura 40- Curva de calibração do trolox, para a determinação do poder de redução.

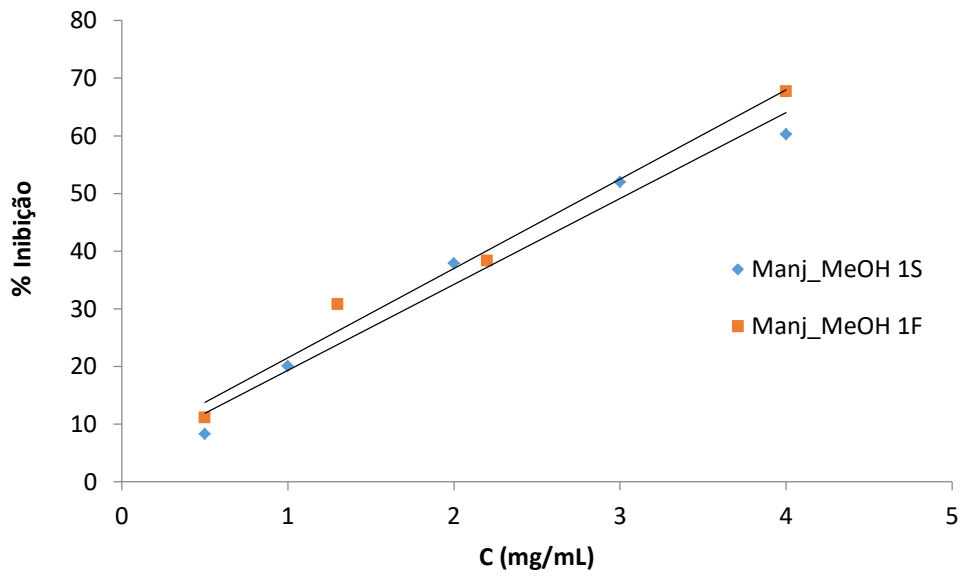
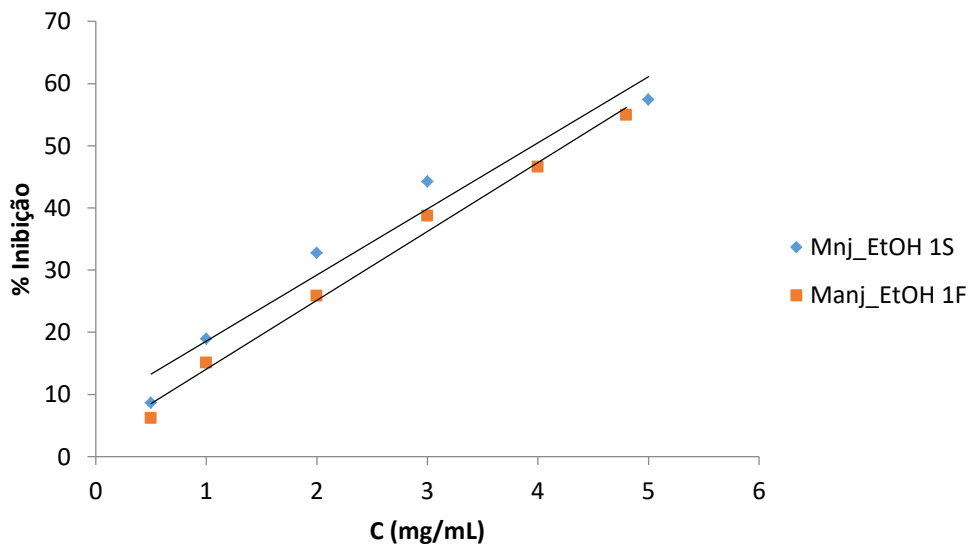
Anexo E – Parâmetros das retas utilizadas na determinação de IC50 do extrato da palmeira anã, no ensaio de DPPH e ABTS.

Tabela 12- Parâmetros de ajustes das retas utilizadas na determinação de IC50, nos ensaios de DPPH e ABTS do extrato da palmeira anã.

Ensaio de DPPH	Extrato	Ext_MeOH_Palmeira Anã	Ácido ascórbico	Trolox
	Reta	Y=a+bX		
	a	5,3368 ± 1,7768	-0,55701 ± 0,4744	-0,59486 ± 1,6444
	b	0,09825 ± 0,00369	0,18982 ± 0,00168	0,1074 ± 0,00323
	r	0,9960	0,9998	0,9960
	LOD (µg/mL)	54,25	7,50	45,93
	LOQ (µg/mL)	180,83	25,00	153,10
Ensaio de ABTS	Extrato	Ext_MeOH_Palmeira Anã	Ácido ascórbico	Trolox
	Reta	Y=a+bX		
	a	11,660 ± 1,837	-0,8363 ± 1,0416	1,803 ± 1,668
	b	0,1083 ± 0,004	0,1535 ± 0,00307	0,1219 ± 0,00422
	r	0,9952	0,9989	0,9958
	LOD (µg/mL)	50,87	20,36	41,06
	LOQ (µg/mL)	169,68	67,88	136,86

Anexo F – Parâmetros das retas utilizadas na determinação de IC50 dos extratos do manjeriço, no ensaio de DPPH e ABTS.**Tabela 13-** Parâmetros de ajustes das retas utilizadas na determinação de IC50, nos ensaios de DPPH e ABTS do extrato da palmeira anã.

Ensaio de DPPH	Extrato	ESC_400:60 Óleo	ESC_400:60 S/ Óleo	Manj_MeOH 1S	Manj_MeOH 1F	Manj_EtOH_1S	Manj_EtOH_1F
	Reta	Y=a+bX					
	a	7,117 ± 1,913	1,513 ± 1,139	8,918 ± 4,129	14,356 ± 4,157	12,410 ± 3,921	5,289 ± 1,430
	b	7,611± 0,299	7,825± 0,207	13,460± 1,508	12,264± 1,0757	9,432± 1,256	10,464± 0,439
	r	0,998	0,999	0,988	0,992	0,983	0,997
	LOD (mg/mL)	0,7539	0,4365	0,9204	1,017	1,247	0,4099
	LOQ (mg/mL)	2,5131	1,455	3,068	3,390	4,157	1,366
Ensaio de ABTS	Extrato	ESC_400:60 Óleo	ESC_400:60 S/ Óleo	Manj_MeOH 1S	Manj_MeOH 1F	EtOH_1S	EtOH_1F
	Reta	Y=a+bX					
	a	24,198 ± 0,132	3,757 ± 3,063	6,670 ± 1,681	18,006 ± 1,976	11,14 ± 1,0071	5,02 ± 1,07
	b	14,815± 0,061	10,053± 0,834	10,163 ± 0,507	8,681 ± 0,596	7,2165 ± 0,2772	6,017 ± 0,23
	r	0,999	0,993	0,996	0,993	0,998	0,997
	LOD (mg/mL)	0,0267	0,9143	0,4962	0,6827	0,4187	0,5326
	LOQ (mg/mL)	0,0891	3,048	1,6542	2,276	1,3956	1,7753

Anexo G – Representação gráfica dos ensaios de DPPH com os extratos de manjeriço.**Figura 41-** Ensaio de DPPH com os extratos metanólicos do manjeriço.**Figura 42-** Ensaio de DPPH com os extratos etanólicos do manjeriço.

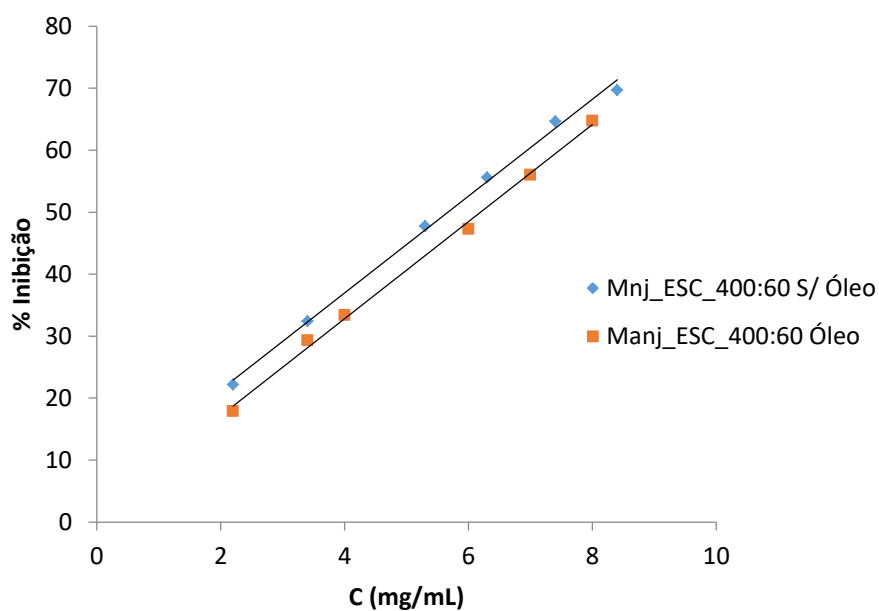


Figura 43- Ensaio de DPPH com os extratos supercríticos do manjeriço.

Anexo H – Representação gráfica dos ensaios de ABTS com os extratos de manjeriço.

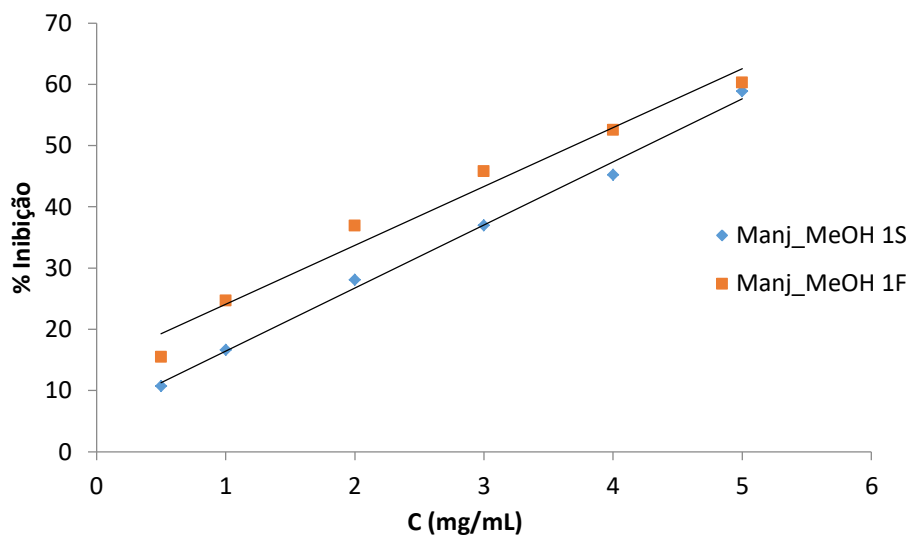


Figura 44- Ensaio de ABTS com os extratos metanólicos do manjeriço.

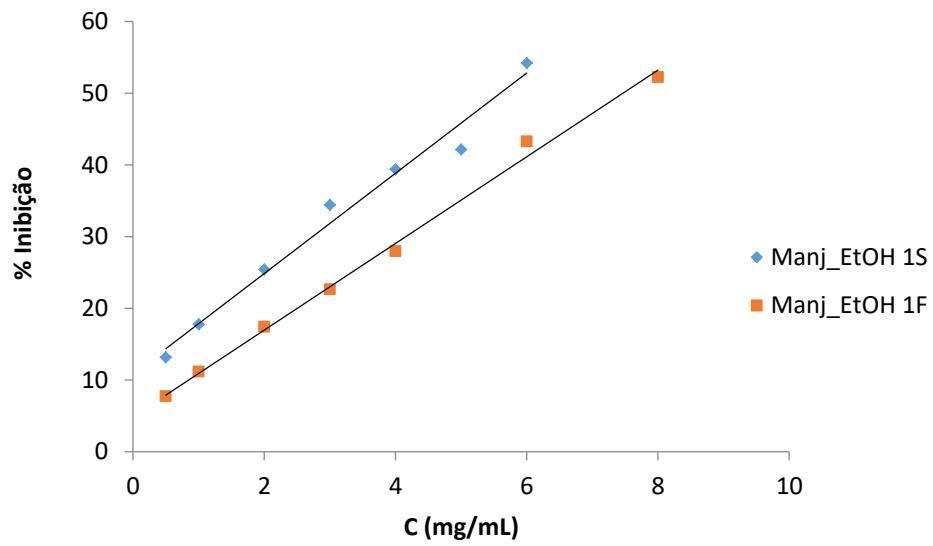


Figura 45- Ensaio de ABTS com os extratos etanólicos do manjeriço.

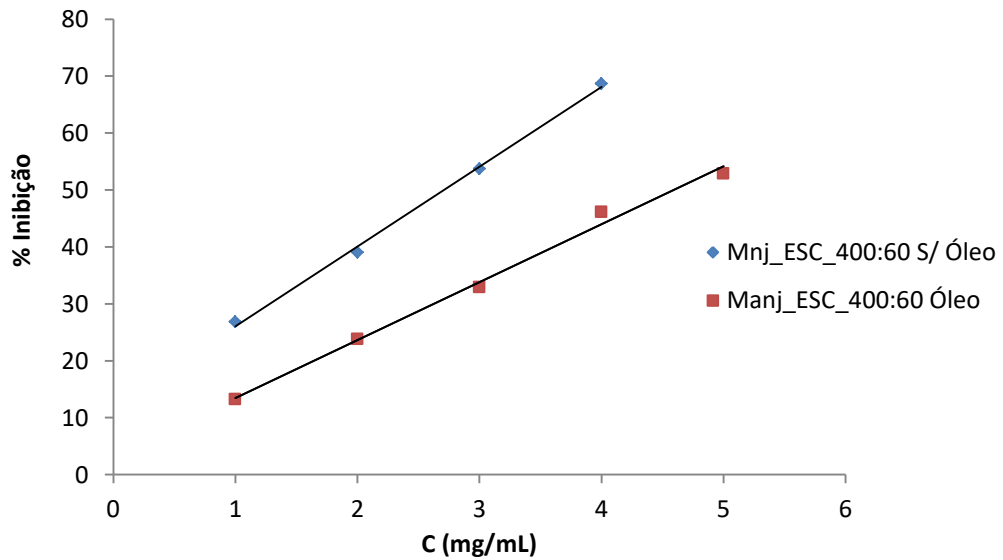


Figura 46- Ensaio de ABTS com os extratos supercríticos do manjeriço.

Anexo I – Representação do rendimento da extração supercrítica do manjericão a 333,15 K e 400 bar, com e sem óleo volátil,

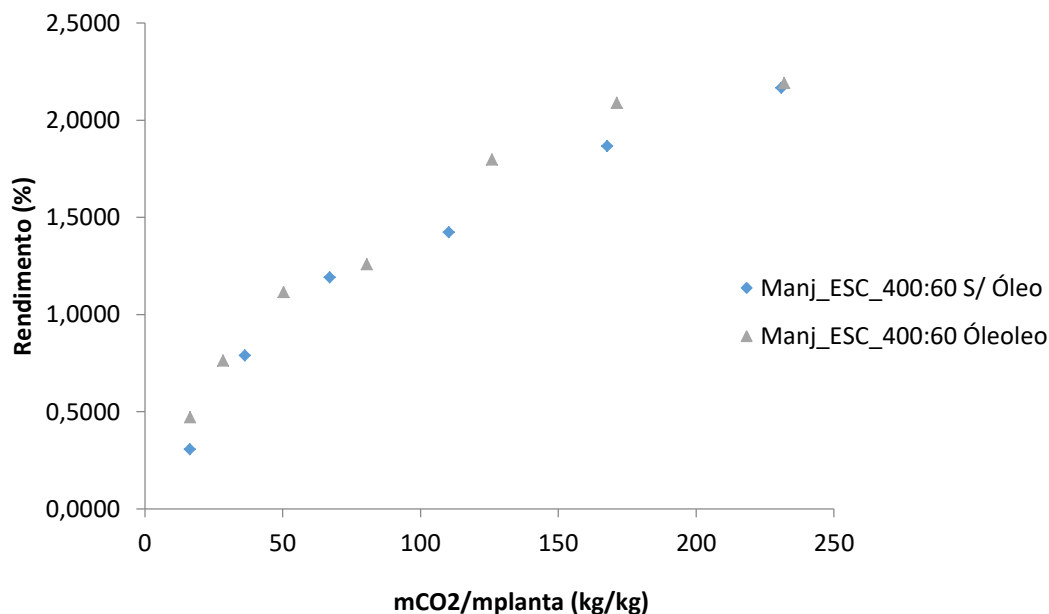


Figura 47- Rendimentos da extração supercrítica do manjericão, com e sem óleo volátil.

Anexo J – Divulgação do trabalho realizado para a comunidade científica.

1. “Determinação da atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras da *Chamaerops humilis* L “J Veiga, J. Coelho iFQB 16 - Fórum de Engenharia Química e Biológica 2016, ISEL, 18 e 19 Lisboa (Apresentação em Painel).
2. “Preliminary phenolic screening of *Chamaerops humilis* L. extracts and their antioxidant capacity activity”, J Veiga, J. Coelho, R Elvas-Leitão, A Brigas, A, Dias, MC Oliveira; **8th Meeting of the Analytical Chemistry Division, SPQ**, Lisbon (Portugal), 6-7 June 2016, Portugal (Comunicação Oral-OC-11).