

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO**

**AÇÃO DO ÁCIDO ABSCÍSIKO E MÉTODO DE  
EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM *Physalis*  
*angulata***

**GISELE CHAGAS MOREIRA**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**FEVEREIRO – 2018**

**AÇÃO DO ÁCIDO ABSCÍSICO E MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE  
COMPOSTOS FENÓLICOS EM *Physalis angulata***

**GISELE CHAGAS MOREIRA**

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Agrárias da Universidade  
Federal do Recôncavo da Bahia,  
como requisito final para a  
obtenção do Título de Mestre em  
Ciências Agrárias (Área de  
Concentração: Fitotecnia).

**Orientador:** Prof. Dr. Fábio de Souza Dias

**Coorientadora:** Profa. Dra. Manuela Oliveira de Souza

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**FEVEREIRO – 2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

M838a	<p>Moreira, Gisele Chagas. Ação do ácido abscísico e método de extração de compostos fenólicos em <i>Physalis angulata</i> / Gisele Chagas Moreira._ Cruz das Almas, BA, 2018. 85f.; il.</p> <p>Orientador: Fábio de Souza Dias. Coorientadora: Manuela Oliveira de Souza.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Plantas – Hormônios vegetais. 2.Plantas – Compostos fenólicos. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 573.4</p>
-------	---

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.  
Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmiento das Chagas  
(Bibliotecário - CRB5 / 1615). Os dados para catalogação foram enviados  
pela usuária via formulário eletrônico.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO**

**AÇÃO DO ÁCIDO ABSCÍSIKO E MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE  
COMPOSTOS FENÓLICOS EM *Physalis angulata***

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO  
DE GISELE CHAGAS MOREIRA**

Realizada em 28 de fevereiro de 2018

Prof. Dr. Fábio de Souza Dias  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB  
Examinador interno (Orientador)

Prof. Dr. Carlos Alan Couto dos Santos  
Instituto Federal da Bahia  
Examinador interno

Prof. Dr. Hugo Neves Brandão  
Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS  
Examinador externo

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa dissertação a minha família, que mesmo distante está na torcida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser meu sustento, minha força e por colocar pessoas tão especiais em minha vida, que fizeram dessa caminhada mais valiosa;

A meus pais, por todo amor do mundo. Mesmo longe fisicamente, o apoio e amor deles são essenciais;

Minhas irmãs e meu sobrinho por completarem nossa família;

A Viny, pelo carinho e por dividir comigo todos os momentos, bons e ruins;

A Laise e Nana, pela amizade;

A Laecio, Raone e principalmente Hack, por ser minha família daqui de Cruz;

A meu orientador Fábio por toda orientação, confiança, paciência e empenho para que pudéssemos realizar um trabalho bem feito;

Aos amigos Diego e Gilvanda pela ajuda durante a execução do projeto;

A minha co-orientadora Manuela, por todo conhecimento;

Aos técnicos Fabrício e Candice, pela amizade e ajuda com o HPLC;

Aos colegas do grupo LAIA, que tornaram a convivência no laboratório prazerosa;

Ao professor Anacleto, pelo auxílio;

Aos funcionários da Fazenda Experimental, por toda prestatividade durante a execução do projeto;

A CAPES, pelo financiamento do projeto.

**Obrigada!**

*“Tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira, você chega lá.” (Ayrton Senna)*

## SUMÁRIO

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**REFERENCIAL TEÓRICO .....1**

**ARTIGO 1**

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE  
COMPOSTOS FENOLICOS EM *Physalis angulata* E DETERMINAÇÃO POR  
HPLC-DAD .....24

**ARTIGO 2**

APLICAÇÃO DE ABA NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM  
*Physalis angulata* ..... 46

**CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... 63**

**ANEXOS ..... 64**



## AÇÃO DO ÁCIDO ABCSÍCICO E MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM *Physalis angulata*

Autora: Gisele Chagas Moreira

Orientador: Dr. Fábio de Souza Dias

**RESUMO** A *Physalis angulata* é conhecida por ser fonte de fitoquímicos, entre eles os compostos fenólicos, que são substâncias que se caracterizam por possuir pelo menos um anel aromático ligado a uma ou mais hidroxilas. A inclusão de compostos fenólicos na dieta pode prevenir diversas doenças, como o câncer e o alzheimer. O ácido abscísico (ABA) é um regulador vegetal com ação similar ao hormônio ABA produzido na planta que interfere em processos fisiológicos, podendo influenciar na síntese dos compostos fenólicos. Para extrair o máximo desses compostos na amostra é utilizado ferramentas estatísticas que possibilitam otimizar o processo de extração, determinando-se as condições ótimas. O planejamento de mistura é uma ferramenta para encontrar a melhor composição da solução extratora e a metodologia de superfície de resposta é utilizada para fazer uma triagem de variáveis que podem interferir no processo de extração. O objetivo deste trabalho foi otimizar um processo de extração de compostos fenólicos em *Physalis angulata* e avaliar a composição fenólica destas plantas quando submetidas a diferentes concentrações de ácido abscísico. O processo de extração otimizada dos compostos fenólicos foi: 0,6 g de material vegetal seco, adicionando 15 mL de solução extratora (57% água, 35% etanol e 8% metanol) e banho ultrassônico por 10 minutos. Foram identificados 4 compostos: catequina, ácido cafeíco, rutina e ácido *trans*-cinâmico. Para avaliar o papel fisiológico do regulador ABA, foram estudadas as seguintes concentrações: 25, 50, 100 e 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , mais a aplicação da solução sem ABA como testemunha. Houve um aumento na concentração de compostos fenólicos totais até a concentração 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A concentração de ácido cafeíco dentro da planta não variou em função da aplicação do ABA, enquanto que, para a rutina, houve um aumento independente da concentração

de ABA. Observou-se um aumento para ácido *trans*-cinâmico até a concentração 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Não foi encontrado catequina nas amostras de *Physalis angulata* quando cultivadas em casa de vegetação, possivelmente pela redução da incidência solar.

**Palavras-chave:** metabólitos secundários, regulador vegetal, extração.

## **ABSCYSIC ACID ACTION AND METHOD OF EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN *Physalis angulata***

Author: Gisele Chagas Moreira

Adviser: Dr. Fábio de Souza Dias

**ABSTRACT:** *Physalis angulata* is known to be a source of phytochemicals that aid in the treatment of various diseases, among them phenolic compounds. These are substances produced by plant species and are characterized by the presence of an aromatic ring attached to a hydroxyl. Some studies show that the inclusion of phenolic compounds in the diet helps to prevent various diseases, as cancer and Alzheimer. Abscisic acid (ABA) is a plant regulator with action similar to the ABA hormone produced in the plant that interferes in physiological processes, and may influence the synthesis of phenolic compounds. In order to extract the maximum of these compounds in the sample, statistical tools are used to optimize the extraction process and determine the optimum conditions. Mixing planning is a tool to find the best composition of the extractive solution and the response surface methodology is used to make a selection of variables that can interfere with the extraction process. The objective of this work was to optimize a process of extraction of phenolic compounds in *Physalis angulata* and to evaluate the phenolic composition of these plants when submitted to different concentrations of abscisic acid. The optimum extraction process of the phenolic compounds was: 0.6 g of dry plant material, adding 15 mL of extractive solution (57% water, 35% ethanol and 8% methanol) and sonic bath for 10 minutes. Four compounds were identified: catechin, caffeic acid, rutin and *trans*-cinnamic acid. To evaluate the physiological role of the ABA regulator, the following concentrations were studied: 25, 50, 100 and 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$  plus the application of the non-ABA solution as a control. There was an increase in the concentration of total phenolic compounds up to the concentration 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . The concentration of caffeic acid within the plant did not vary as a function of the ABA concentration, whereas for the rutin, there was an independent increase in ABA concentration. An increase for *trans*-cinnamic acid was observed up to the concentration 50

$\mu\text{mol L}^{-1}$ . No catechin was found in the *Physalis angulata* samples when grown in a greenhouse, possibly due to the reduction of the solar incidence.

**Keywords:** secondary metabolites, plant regulator, extraction.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### 1. *Physalis angulata* L.

O uso de produtos de origem vegetal que tratam de diversas doenças aumentou devido à ampla diversidade de plantas que possuem atividade biológica comprovada, pois possuem em sua composição diferentes princípios ativos, sendo conhecidas como plantas medicinais (CHOI & HWANG, 2003; VIEGAS; BOLZANI & BARREIRO, 2006; GUIMARÃES et al., 2010). Entre as plantas medicinais, destacam-se as do gênero *Physalis*, que pertencem à família Solanaceae, que compreende espécies como *Solanum lycopersicum* (tomate), *Capsicum* spp. (pimentão, pimenta), *Solanum tuberosum* (batata); subfamília Solanoideae, e, no Brasil, são encontradas 8 espécies do gênero (SILVA, AGRA, 2005; SOUZA et al., 2010; REFLORA, 2017).

A maioria das espécies do gênero *Physalis* é herbácea, anual ou perene, nativas da América do Norte e América do Sul (SALGADO & ARANA, 2013). São facilmente reconhecidas pelo fruto, do tipo baga, por causa do conjunto de sépalas que o envolvem persistindo em todo seu ciclo de vida, protegendo-o contra patógenos, pássaros, entre outros (SILVA, AGRA, 2005; SOUZA, SOUZA & PELACANI, 2011). Entretanto, esta semelhança morfológica das flores e frutos entre as espécies dificulta a identificação taxônomica (TAVARES et al., 2016).

Algumas espécies possuem importância na alimentação humana como a *P. peruviana* que é a espécie mais disseminada comercialmente e, recentemente, tem sido incorporada ao grupo de pequenas frutas exóticas. Entretanto, seu cultivo no Brasil ainda é restrito a pequenas áreas. E a espécie *P. ixocarpa* L. tem grande importância na culinária mexicana (SILVA & AGRA, 2005; SILVA et al., 2016). Tendo em vista que alguns benefícios à saúde já são conhecidos, o consumo de frutos destas espécies pode contribuir para a prevenção de doenças (Figura 1) (ROCKENBACK et al., 2008; SEVERO et al., 2010; MARES et al., 2016). Portanto, é importante avaliar as características agrônômicas e atributos nutricionais de plantas de *Physalis*, pois as espécies selvagens são importantes para o desenvolvimento de novas culturas alternativas, promovendo a diversidade na dieta humana (Figura 1) (MARES et al., 2016).

Além da importância alimentícia possuem aplicação artesanal e ornamental (SANCHEZ, VARGAS & ZAMORA, 2008).

Outras espécies do gênero são conhecidas por serem fontes de substâncias oriundas do metabolismo secundário, denominadas seco-esteroides, comumente conhecidas como fisalinas, que podem auxiliar no tratamento de diversas patologias, sendo a *P. angulata* a espécie em que esses seco-esteroides são mais estudados (Figura 2) (RIBEIRO et al., 2002; LIGARRETO, LOBO & CORREA, 2005)

Conhecida como fisalis, camapu, juá de capote ou mullaca, sabe-se que sua origem é colombiana, local onde é amplamente cultivada e pode ser encontrada em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (SOARES et al., 2003; LISSNER et al., 2009; SEVERO et al., 2010). No Brasil é cultivada principalmente nas regiões Norte e Nordeste (SOUZA, SOUZA & PELACANI, 2011).

A *P. angulata* apresenta caule anguloso, folhas ovadas, geralmente a margem é serrada e o ápice é atenuado e os frutos possuem, aproximadamente, 13 mm de diâmetro (Figura 3) (LIGARRETO, LOBO & CORREA, 2005).

É uma planta rústica, arbustiva, herbácea e anual, sendo possível cultivá-la comercialmente por até 3 anos e a produção de frutos ocorre em, aproximadamente 90 dias (LIMA et al., 2009; LISSNER et al., 2009; SOUZA et al., 2010). Mas, apesar de toda sua importância, ainda há pouca informação sobre a cultura, por isso o manejo empregado no cultivo (como tutoramento, irrigação, adubação) ainda é realizado seguindo as recomendações para a cultura do tomate (LIMA et al., 2009; SILVA et al., 2016).

Embora algumas comunidades indígenas já possuam o hábito de comer o fruto, sua principal aplicação ainda consiste em utilizar folhas, frutos e raízes, macerados, como anti-inflamatório, anticoagulante, diurético, entre outros (SOUZA, ALCÂNTARA JÚNIOR & AMORIM, 2007; SOUZA et al., 2010; SOUZA, SOUZA & PELACANI, 2011).

Os estudos com esta espécie iniciaram na década de 90 e com aumento do interesse pelas suas propriedades terapêuticas, foram identificados um conjunto de fitoquímicos, tais como flavonoides, alcaloides e muitos outros tipos de esteroides vegetais que, devido a sua estrutura, possuem diversas funções biológicas, ou seja, compostos de interesse nutricional e farmacológico

(RIBEIRO et al., 2002; LUSAKIBANZA et al., 2010; SALGADO & ARANA, 2013; SILVA et al., 2016).

Em aproximadamente 10 países são relatados 26 tipos de uso (SALGADO et al., 2013). Em Taiwan, a *P. angulata* é utilizada para o tratamento da hepatite (WU et al., 2004). No Congo, é utilizada como alimento e as folhas ou a planta inteira são usadas para curar a malária (LUSAKIBANZA et al., 2010). Na Bolívia, utiliza-se a raiz para o tratamento da febre e na Paraíba as folhas são utilizadas como sedativo e contra inflamações do baço e da bexiga (AGRA et al., 2007; BOURDY et al., 2000).

Estudos conduzidos com diferentes partes da planta demonstram seu potencial farmacológico (SALGADO & ARANA, 2013). Soares et al. (2006) e Adnyana et al. (2014) demonstram a utilização de *P. angulata* no tratamento de doenças auto-imunes como lúpus, alergias, bem como eficácia na redução dos efeitos da rejeição de órgãos transplantados.

Choi e Hwang (2003) estudaram a ação anti-inflamatória e antialérgica do extrato metanólico da flor. Bastos et al. (2008) avaliaram ação anti-inflamatória e imunossupressoras, utilizando testes *in vivo* e *in vitro*, com o extrato aquoso da raiz. Lee et al. (2009) relataram que *P. angulata* inibe a proliferação de células de câncer oral, embora ainda seja desconhecida sua atividade. Ribeiro et al. (2002) encontraram atividade antitumoral contra cinco linhagens de células cancerosas humanas.

Salgado et al. (2013) apontam o efeito antimalárico e atividade antiasmática. E, no tratamento da leishmaniose cutânea, o uso de fitoesteróis pode ser um remédio alternativo (GUIMARÃES et al., 2010).

O interesse em novas drogas de origem natural é crescente não só para o tratamento de doenças humanas, mas também estende-se ao controle de vetores. Santos et al. (2003) comprovaram que *P. angulata* possui atividade moluscicida, isto é, controlam o caracol transmissor da esquistossomose. Meira et al. (2015) demonstraram que o extrato etanólico possui um efeito antiparasitário eficiente contra o *Trypanosoma cruzi*, interrompendo rapidamente o ciclo de vida no hospedeiro.

*P. angulata* possui atividade antiplasmodiais contra *Plasmodium falciparum*, um protozoário parasita que causa malária, todavia os compostos

responsáveis por esta propriedade ainda são desconhecidos (LUSAKIBANZA et al., 2010).

Com base na baixa toxicidade da *P. angulata* e sua utilização tanto na medicina popular quanto na medicina tradicional sintética, é preciso o desenvolvimento de mais pesquisas com esta espécie, que viabilizem a produção de diversos produtos, como medicamentos, ingredientes alimentares, óleos essenciais (SALGADO et al., 2013).

Como podem ser constatadas pelos trabalhos anteriores, diversas propriedades medicinais têm sido atribuídas às diferentes partes da *P. angulata*, todavia, poucos estudos sobre sua composição fenólica foram relatados. Segundo VELASCO et al., 2017, grandes variações na composição fenólica podem ser encontradas dependendo da idade e do órgão da planta analisado, sendo as folhas a melhor fonte de flavonoides totais.

## **2. Conceito, classificação e função dos compostos fenólicos**

Radicais livres são moléculas altamente reativas devido à presença de um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo que, na tentativa de se estabilizar, sequestram elétrons de biomoléculas a sua volta, como proteínas, carboidratos e lipídios comprometendo a função dessas biomoléculas nas células (VASCONCELOS, ALVES & LIMA, 2000). O excesso de radicais livres oriundos da respiração aeróbica ou de fatores externos, tais como, inflamações, radiações gama e ultravioleta, ozônio, cigarro, medicamentos, pode provocar estresse oxidativo, que é responsável por causar doenças cardiovasculares, câncer, aterosclerose, desordens inflamatórias (BIANCHI & ANTUNES, 1999; LIMA, MELO & LIMA, 2002; SILVA et al., 2010; TUKUN et al., 2014).

Qualquer substância capaz de inibir os danos causados pela oxidação é chamada de antioxidante (SILVA et al., 2016). O organismo humano desenvolveu mecanismos de defesa para lidar com esses estresses oxidativos através de suas enzimas: superóxido dismutase, ascorbato redutases, peroxidases e catalases, todavia, antioxidantes exógenos podem auxiliar essas enzimas na função antioxidante (SEVERO et al., 2010; SILVA et al., 2010). Contudo, problemas causados pelo uso de antioxidantes sintéticos, como sua



fácil decomposição em altas temperaturas e volatilidade, aumentam o interesse dos pesquisadores por antioxidantes naturais (HINNEBURG, DORMAN & HILTUNEN, 2005; SOUZA et al., 2007).

Os principais antioxidantes naturais são: vitamina C e E, carotenoides e compostos fenólicos. Portanto a ingestão de vegetais que possuam antioxidantes em sua composição reduz o risco de muitas doenças (SILVA et al., 2010). Além dos benefícios à saúde, eles podem ser utilizados como ingredientes alimentares a fim de evitar a deterioração durante o processo e armazenamento dos alimentos e também podem ser adicionados a bebidas e cosméticos (TUKUN et al., 2014).

Os compostos fenólicos são um grupo extenso de substâncias, que são caracterizados pela presença de pelo menos um anel aromático e uma hidroxila que substitui o hidrogênio, podendo ser encontrados em frutas, legumes, sementes e até mesmo chocolates (SPENCER et al., 2008; EFRAIM, ALVES & JARDIM, 2011; CARVALHO, GOSMANN & SCHENKEL, 2001). Neste grupo incluem fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, taninos, ligninas e flavonoides (LIMA, MELO & LIMA, 2002; NACZK & SHAHIDI, 2004).

### **2.1 Os compostos fenólicos na planta**

Os compostos fenólicos são o resultado do metabolismo secundário das plantas, em que algumas enzimas são responsáveis por redirecionar a rota metabólica de processos essenciais como fotossíntese e respiração, produzindo os metabólitos secundários que possuem atividade biológica (PEIXOTO NETO & CAETANO, 2005; TUKUN et al., 2014). Chama-se metabolismo secundário um conjunto de reações químicas que levam a produção de um metabólico cujo produto assegura condições para sobrevivência e perpetuação da espécie vegetal produtora, embora não seja necessariamente essencial ao organismo (SANTOS, 2001).

A concentração de compostos fenólicos nas plantas varia em função da idade, das condições de crescimento, na interação planta/microorganismo, planta/planta, planta/inseto, nutrição, luminosidade, temperatura, etc, podendo apresentar correlações entre si, não atuando isoladamente, influenciando o metabolismo secundário e podendo modificar suas propriedades medicinais (MORAIS et al., 2009; VELASCO et al., 2017). A atividade biológica desses

compostos depende de sua estrutura química, solubilidade, grau de polimerização, conjugação com outras substâncias, interferindo na sua absorção e metabolização no organismo humano (MIRA et al., 2008).

Na planta desempenham uma gama de funções, atuando como repelente de insetos, alelopatia, inibindo o crescimento de outras espécies ou atraindo polinizadores (WU et al., 2000; PEIXOTO NETO & CAETANO, 2005). A composição fenólica de certos produtos alimentícios como sucos industriais pode fornecer informações sobre o processamento aplicado ao fruto, pois alguns compostos fenólicos são característicos de determinadas espécies (WU et al., 1999; ANGELO & JORGE, 2007).

## **2.2 Benefícios dos compostos fenólicos na saúde humana**

Muitos desses compostos apresentam atividade antioxidante, devido às suas propriedades redutoras e estruturas químicas (SOUZA et al., 2007). Os compostos fenólicos rompem a cadeia do radical livre doando um átomo de hidrogênio (BAYDAR e BAYDAR, 2013). Além de atuar como antioxidantes, os compostos fenólicos podem contribuir para prevenção de doenças degenerativas, cardiovasculares, asma e doenças alérgicas (ZHOU et al., 1993, MANACH, MAZUR & SCALBERT, 2005).

Estabelecer, contudo, todos os benefícios associados ao uso de compostos fenólicos ainda é uma tarefa difícil devido aos desafios existentes como a limitação no entendimento de sua absorção e rota metabólica. Além da própria complexidade e estrutura do grupo entre os alimentos e, conseqüentemente, dificuldades em determina-los nas amostras vegetais com precisão (STALIKAS, 2007; SPENCER et al., 2008).

A concentração de fenólicos totais já é estudada em plantas do gênero *Physalis*. Os frutos de *Physalis peruviana* já são conhecidos por serem fontes de compostos fenólicos (WU et al., 2005, ROCKENBACK et al., 2008). De acordo Velasco et al. (2017) as raízes de *P. angulata* não apresentam quantidades significativas de compostos fenólicos, mas as folhas, caule, flores e cálices possuem grande potencial de ser fonte de alguns compostos fenólicos, possivelmente pela exposição a radiação solar (ABREU et al., 2017).

Fatores como as condições de armazenamento e a parte vegetal da planta influenciam no conteúdo de fenólicos, por isso, para cada condição que a planta

é cultivada, faz-se necessário estudos sobre esses metabólitos (ROCKENBACK et al., 2008; SEVERO et al., 2010; SILVA et al., 2016).

Sabendo-se que os estímulos do ambiente podem redirecionar a rota metabólica das plantas, sintetizando, assim, novos compostos, o metabolismo secundário serve então como um indicador da adaptação química das plantas sob as condições de crescimento (MORAIS et al., 2009; BEREZINA, BRIKINA & VESELOW, 2017). Então é importante compreender os fatores que afetam o acúmulo de metabólitos secundários e o papel que estes compostos fenólicos desempenham principalmente na espécie em estudo. Sabe-se que o conteúdo de compostos fenólicos totais em *P. angulata* depende das partes da planta que serão estudadas (KUSUMANINGTYAS, LAILY & LIMANDHA, 2015).

Embora existam muitos estudos sobre o metabolismo de compostos fenólicos regulados pelas condições ambientais, o conhecimento sobre o efeito da aplicação de reguladores tais como, ácido abscísico, em plantas medicinais, ainda é escasso. Além de testes farmacológicos, é preciso realizar testes na matéria-prima vegetal, neste caso, *P. angulata* (STALIKAS, 2007).

### **3. Aplicação de ácido abscísico em plantas (ABA) na produção de metabólitos secundários**

Hormônio é um composto produzido na planta, que em baixas concentrações, promovem, modificam ou inibem diferentes respostas fisiológicas e reguladores vegetais são substâncias sintéticas, aplicada exogenamente, que possuem ação similar aos hormônios (VIEIRA et al., 2010).

Os cinco principais hormônios reguladores de crescimento e desenvolvimento da planta são: etileno, auxina, giberelina, citocinina e ácido abscísico (ABA) (VIEIRA et al., 2010; ZENY & TROJAN, 2016).

Informações relacionadas aos hormônios ainda são raras, podendo levar anos para sua comprovação e com a aplicação de reguladores é possível ter um posicionamento sobre fenologia e metabólitos (ZENY & TROJAN, 2016). O uso de reguladores se dá em baixas concentrações, podendo ser utilizado separadamente ou combinado entre si. Por exemplo, tratamento com reguladores vegetais como o ABA e giberelina, podem preparar a planta para lidar com condições de estresse biótico e abiótico, porém deve-se levar em

consideração o tecido da planta e o que se deseja obter (regenerar parte aérea, raiz, aumentar produção de metabólitos secundários, etc) (BERTONCELLI & OLIVEIRA, 2010; MURCIA et al., 2017). A aplicação de reguladores de crescimento em plantas tem um papel importante no crescimento quantitativo e qualitativo das espécies vegetais, por isso, vem sendo estudado por muitos pesquisadores (BERLI et al., 2010; PACHECO, CASTRO & SOUZA, 2011; JAMALIAN, GHOLAMI, ESNA-ASHARI, 2013).

O ABA foi descoberto em 1960. É um terpenoide de 15 carbonos, encontrado em plantas vasculares, musgos, alguns fungos fitopatogênicos e metazoários (TAIZ et al., 2017). É sinalizado como mensageiro nas vias de resposta a condições de estresse, tais como, hídrico, salino e térmico, inicialmente regulando os estômatos por um processo gradual em função desses estresses, exercendo diversos efeitos fisiológicos no crescimento e desenvolvimento da planta (Figura 4) (PACHECO, CASTRO & SOUZA, 2012; NEGIN & MOSHELION, 2016; TAIZ et al., 2017).

No endosperma das sementes, o ABA pode interferir no processo de produção da giberelina, limitando a germinação, isto é, regula a maturação e a dormência de sementes. Em relação às características vegetativas e a fisiologia da planta, o ABA promove a senescência, precedendo à abscisão, regula algumas respostas a patógenos, o fechamento estomático mesmo em presença da luz, impedindo as trocas gasosas, o crescimento de raízes e parte aéreas, florescimento e pode estar envolvido também no processo de maturação (PEREIRA et al., 2002; LACAMPAGNE, GAGNÉ & GENY, 2010; TAIZ et al., 2017).

É possível que o ABA exógeno modifique a atividade metabólica da planta, desempenhando importante papel na ativação de compostos antioxidantes como resposta de defesa e crescimento a condições de estresse, entretanto, os resultados podem variar entre as espécies e, dentro de uma mesma espécie, para cada cultivar (JAMALIAN, GHOLAMI, ESNA-ASHARI, 2013; KARIMI & ERSHADI, 2015). As respostas provocadas pela aplicação do ABA podem ocorrer em todos os órgãos, modificando não só o metabolismo secundário, como também o metabolismo primário (MURCIA et al., 2017).

Em alguns trabalhos a aplicação de ABA é utilizado para provocar mudanças no balanço hormonal como, por exemplo, nas uvas, melhorando consideravelmente o potencial da viticultura, pois os compostos fenólicos desempenham papel fundamental na qualidade do vinho, além disso, pode estar envolvido na ação do metabolismo da antocianina, entre outros efeitos (CATIN et al., 2007; LACAMPAGNE, GAGNÉ & GENY, 2010).

Jamalian et al. (2013) confirmam o papel eficaz do ABA exógeno na produção de compostos fenólicos na uva, principalmente na quantidade de ácido ferúlico. Porém, sua aplicação afetou o crescimento da raiz e o rendimento de massa seca e fresca do vegetal, em condições provocadas por estresse salino.

Berli et al. (2010) observaram que o ABA proporcionou aumento de enzimas antioxidantes, ácido cafeíco e esteróis na membrana plasmática, além de estar envolvido na tolerância ao estresse causado por radiação ultra-violeta em folhas de uva (cv Malbec).

Em videiras 'Sultana' a maior dose estudada de ABA proporcionou o maior conteúdo de compostos fenólicos totais, que podem atuar como antioxidantes e desintoxicar a planta em condições de estresse. Além de minimizar os danos causados por baixas temperaturas, foi eficiente em inibir o crescimento da parte aérea, queda das folhas e promoveu o desenvolvimento acelerado da periderme, isto é, aumento dos tecidos foliares (KARIMI & ERSHADI, 2015). Em uvas Cabernet Sauvignon, a aplicação exógena de ABA melhorou a pigmentação das cascas, alteraram a sua maturação, aumentaram a quantidade de antocianinas, compostos fenólicos e sua atividade antioxidante (GARDIN et al., 2012).

Em uva 'Isabel' também foi observado aumento da antocianina, porém sem alterações em suas características físicas (KOYAMA et al., 2014). Em uvas 'Crimson Seedless' antecipou a data de colheita, pois melhorou rapidamente a cor da uva que pode estar relacionada com o acúmulo de antocianinas, sem nenhuma alteração em sua qualidade (CANTIN, FIDELIBUS & CRISOSTO, 2007).

Em morango, o ABA exógeno proporcionou aumento nos teores de fenólicos e antocianinas e, como resultado, o desenvolvimento das cores vermelhas foi acelerado (JIANG & JOICE, 2003).

Por outro lado, a aplicação de ABA em plantas de calêndula (*Calendula officinalis* L.) reduziram os teores de flavonoides, o que pode sinalizar uma restrição à ação das enzimas relacionadas com a sua síntese (PACHECO, CASTRO & SOUZA, 2011).

Huang et al. (2016) demonstraram que o ABA inibiu o acúmulo de alguns metabólitos em cevada.

Desta forma, são necessários estudos que complementem as informações existentes sobre a aplicação de reguladores vegetais, direcionados a espécies medicinais, como *P. angulata*, para compreensão do papel do mesmo no metabolismo da planta e como isso poderá interferir em suas propriedades medicinais.

#### **4. Extração de compostos fenólicos em amostras biológicas e de alimentos**

O preparo da amostra é uma das etapas mais importantes na sequência analítica, pois é a etapa mais laboriosa e na qual ocorre a maioria dos erros experimentais como, por exemplo, perda do analito (STALIKAS, 2007; MICHALKIEWICZ et al., 2008).

A extração de metabólitos em planta consiste na transferência do analito presente na amostra sólida para uma fase líquida extratora. Antes de realizar a extração da amostra sólida, a amostra fresca é seca e triturada, para se obter uma amostra homogênea e com elevada superfície de contato (LIAZID, 2008). A extração solido-líquido e líquido-líquido são os procedimentos mais utilizados para a separação dos compostos fenólicos em vegetais (STALIKAS, 2007).

Diferenças encontradas na literatura sobre a composição fenólica de um mesmo tipo de amostra são explicadas não somente pela diferença no processamento das amostras, mas também, pode ocorrer uma extração ineficaz destes compostos devido à falta de otimização do sistema envolvendo o tipo de solvente que compõe a solução extratora, entre outras variáveis, como tempo e temperatura a ser utilizado para cada amostra em particular, por isso o procedimento de extração representa um passo fundamental para o sucesso nas etapas posteriores da análise (BOSSO et al., 2016; HANDA et al., 2016).

O primeiro passo no desenvolvimento de um procedimento de extração é selecionar o solvente, pois os diferentes sistemas de solventes utilizados afetam significativamente a eficiência da extração (SOARES et al., 2008). Possivelmente, cada composto requer uma condição de extração diferente, como, por exemplo, para extrair o ácido oleanólico e ursólico, utilizou-se uma mistura de água com 90% e 70% de etanol, respectivamente, que estão entre os solventes mais utilizados, além do metanol, acetona, éter e acetato (STALIKAS, 2007; BERNATONIENE et al., 2016). Muitos autores consideram o etanol como um dos mais apropriados para extração de fenólicos em material vegetal, porém, nos casos de ácidos fenólicos muito polares, recomenda-se misturas de solventes (STALIKAS, 2007). Variações nas soluções contendo os diferentes solventes, em diferentes proporções, provocam alterações na quantidade de analitos extraídos e também mudanças qualitativas na composição do extrato (SAHIN; SAMLI, 2013; BOSSO et al., 2016; HANDA et al., 2016).

A água é um solvente polar bastante utilizado, mas, devido a sua alta viscosidade, é associado a outros solventes para se obter melhores resultados, como, por exemplo, o etanol que possui viscosidade mais baixa, altera a estrutura da planta, permitindo que o solvente penetre completamente nas folhas (SAHIN; SAMLI, 2013). O etanol é considerado um solvente seguro para aplicação em sistemas alimentares, enquanto o metanol, embora seja bastante utilizado, é um solvente orgânico considerado tóxico (BERNATONIENE et al., 2016; HE et al., 2016).

Kusumaningtyas, Laily & Limandha (2015) estudaram a natureza dos solventes utilizados na extração de compostos fenólicos em folhas e frutos de *P. angulata*. O etanol em comparação com a água foi o solvente que apresentou os melhores resultados de recuperação de compostos fenólicos totais nas amostras.

Existem diversas técnicas para extração de compostos fenólicos. Métodos convencionais sujeitam à amostra a baixa eficiência de rendimento, tempo e perda de alguns compostos, visto que alguns são sensíveis à temperatura e vulnerável a mudanças químicas, biológicas e físicas (CHEMAT & KHAN, 2011). A maceração é um processo que a amostra entra em contato com o solvente extrator pelo tempo necessário e temperatura determinada. É necessário filtrar a amostra; No soxhlet, a amostra é colocada em um recipiente de extração e é

lixiviada a um solvente quente durante o tempo determinado; Na extração assistida por microondas, a amostra é colocada em um recipiente aberto ou fechado e, em seguida, é fornecida energia em forma de micro-ondas (LIAZID, 2008). O ultrassom é comumente utilizado na extração de vários analitos em amostras vegetais, frutas, óleos e leite, pois melhora significativamente a extração desses compostos contidos no material a ser estudado (MASON, PANIWNKYK & LORIMER, 1996; CHEMAT & KHAN, 2011).

Fenômenos físicos e químicos fazem parte do processo de sonicação (CHEMAT & KHAN, 2011). O uso do ultrassom produz cavitações a partir de suas ondas ultrassônicas. A região em torno das bolhas de cavitação possui alta temperatura, pressão e possivelmente gradientes de campo elétrico favorecendo uma maior penetração dos solventes em materiais celulares, melhorando a eficiência da extração e reduzindo o uso de solventes tóxicos, que é desejável para extração de compostos bioativos (MASON, PANIWNKYK & LORIMER, 1996; SUSLICK & GARETH, 1999; HE et al., 2016). Os efeitos físicos do ultrassom incluem transferência de massa, aquecimento térmico, emulsificação e uma variedade de efeitos em sólidos (SUSLICK & GARETH, 1999).

Em termo de produtividade, seletividade e rendimento, o ultrassom oferece uma série de vantagens, tais como, redução de perigos físicos e químicos, qualidade aprimorada, menor tempo de processamento e pouco nocivo ao meio ambiente, pois contribuem para redução do uso de energia e solventes (CHEMAT & KHAN, 2011).

O processo de extração assistida por ultrassom é afetado por diversos fatores como temperatura, tamanho da partícula e tempo de sonicação e sua aplicação consiste em três métodos diferentes: aplicação direta do produto, conexão com o dispositivo e banho ultrassônico (CHEMAT & KHAN, 2011; TAO et al., 2014).

A influência desses parâmetros que potencializam a eficiência da extração, tais como, temperatura, tempo de sonicação, solvente utilizado, já vem sendo estudado em amostras de mangaba, umbu, azeitona e mel (Tabela 1) (MICHALKIEWICZ et al., 2008; GOMES et al., 2013; SAHIN & SAMLI, 2013).

A extração assistida por ultrassom pode ser mais eficiente quando comparada à extração convencional (maceração), que utiliza apenas calor e/ou agitação (MASON, PANIWNKYK & LORIMER, 1996; TAO et al., 2014). Após a



extração, diferentes métodos são utilizados para quantificação e determinação destes compostos fenólicos, sendo a cromatografia líquida a mais utilizada (Tabela 1).

## **5. Determinação de compostos fenólicos em plantas**

Para determinação de compostos fenólicos totais o método mais utilizado é o espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu que é constituído por sais de tungstênio, molibidênio e outros reagentes (ARCHELA & ANTONIA, 2013). Os ânions presentes no reagente de Folin-Ciocalteu oxidam os compostos fenólicos, que devem estar na forma de fenolato. O número de grupos oxidáveis e hidroxilas controla a intensidade da cor formada. As moléculas reduzidas são azuis e as não reduzidas são amarelas. O método de Folin-Ciocalteu não é um método específico, isto é, reage com qualquer substância que apresente o grupo fenólico em sua constituição, podendo interferir no resultado (ANGELO & JORGE, 2007).

Por outro lado, o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa com detector de arranjo de diodo tem sido a técnica mais utilizada para a separação dos compostos fenólicos que permite separar e quantificar as substâncias presentes na amostra (TONHI et al., 2002). As fases móveis mais comumente empregadas são acetonitrila ou metanol em uma mistura com ácido acético (DIAS et al., 2017).

Esta técnica de separação acoplada as mais diversas técnicas de detecção é uma ferramenta importante para a determinação de compostos fenólicos nas mais variadas matrizes, porém pode haver dificuldade na determinação direta destes analitos que podem estar em concentrações em níveis muito baixos ou cuja matriz apresente muitos interferentes (DIAS, SILVA & DAVID, 2013; GOMES et al., 2013; HE et al., 2016; AL-DHABI et al., 2017), então nestes casos faz-se necessário o uso de técnicas para separar e pré-concentrar o analito presente na amostra (DIAS et al., 2010; TEODORO et al., 2017).

## **6. Otimização utilizando estatística multivariada**

Para desenvolver um método analítico é necessário utilizar modelos estatísticos que possam estimar sua eficiência (BRITO et al., 2003). Na estatística univariada é realizado o estudo de uma única variável, não sendo possível o estudo das demais variáveis que também podem interferir no processo de extração e suas interações, tornando impossível encontrar valores

ótimos, enquanto que a estatística multivariada permite o estudo de mais variáveis por meio do planejamento fatorial, tornando o processo mais efetivo e econômico (BEZERRA, 2005; GROBE, 2006).

Para realizar um planejamento fatorial, o pesquisador precisa definir os níveis que cada variável será estudado e requer que todas as combinações possíveis sejam experimentadas (BARROS NETO, SCARMINIO & BRUNS, 1995).

Em planejamentos fatoriais é possível reduzir o número de experimentos utilizando programas estatísticos como SPS, SYSTAT, STATISTICA que realizam operações por meio de modelos matemáticos, como a metodologia de superfície de resposta, para obter os principais componentes que interferem na extração, pois dentro de um sistema algumas variáveis são mais relevantes que outras, reduzindo assim o número de dados (MOITA NETO & MOITA, 1998). Isto é, na estatística multivariada, a superfície de resposta determina quais são as combinações das variáveis pré-selecionadas que podem otimizar a resposta (REIS & ANDRADE, 1996).

Na metodologia de superfície de resposta os planejamentos mais utilizados são: Box-Behnken, central composto e matriz de Doehlert. O planejamento Doehlert possibilita estudar uma variável em mais níveis do que outra e isso é desejável quando uma variável interfere no processo de forma mais significativa, mostrando alta eficiência (Figura 6) (Tabela2) (BEZERRA, 2005). Menezes (2017) utilizou o planejamento Doehlert para determinar quais parâmetros físico-químicos que potencializavam a produção de compostos bioativos em cogumelos.

A partir de um planejamento experimental de misturas, pode-se verificar como o sinal analítico é afetado pela proporção dos componentes da mistura, possibilitando encontrar a melhor composição da mistura que proporcione um maior sinal analítico no sistema estudado, realizando somente alguns experimentos (Figura 7) (BARROS NETO, SCARMINIO & BRUNS, 1995; REIS & ANDRADE, 1996). Segundo Barros Neto, Scarminio & Bruns (1995) “a existência dessa restrição impõe algumas modificações nas metodologias que já discutimos, como o emprego de planejamentos fatoriais”.

Handa et al. (2016) encontraram a relação 0.5:0.375:0.125 de água, etanol e metanol, respectivamente, para extração de compostos fenólicos e a

atividade antioxidante em amostras de farinha de soja. Zielinski (2015) encontrou a maior conteúdo de compostos fenólicos em amostras de chá branco, utilizando o planejamento de mistura simplex centroide com três diferentes tipos de chá. Borsato et al. (2010) determinaram a melhor composição de antioxidantes sintéticos que pudesse prevenir a degradação do biocombustível.

O objetivo deste trabalho foi otimizar o processo de extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos em *Physalis angulata* e estudar o efeito na composição fenólica desta espécie quando submetida a diferentes concentrações de ácido abscísico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. B. et al. Growth and Evaluation of Phenolic Compounds in *Physalis angulata* L. at Two Different Periods in the Bahia Reconcavo, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 10, p. 145, 2017.

AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p.383-395, maio 2007.

AL-DHABI, N. A.; PONMURUGAN, K.; JEGANATHAN, P. M. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 34, p. 206-213, 2017.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ARCHELA, E.; ANTONIA, L. H. D. Determinação de compostos fenólicos em vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 193-210, 2013.

BAYDAR, N G; BAYDAR, H. Phenolic compounds, antiradical activity and antioxidant capacity of oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 375– 380, 2013.

BEREZINA, E.V.; BRILKINA, A.A.; VESELOV, A.P. Content of phenolic compounds, ascorbic acid, and photosynthetic pigments in *Vaccinium macrocarpon* Ait. dependent on seasonal plant development stages and age (the example of introduction in Russia). **Scientia Horticulturae**, v. 218, p.139-146, 2017.

BERLI, et al. Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet-absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 1–10, 2010.

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

BERTONCELLI, D. J.; OLIVEIRA, M. C. Avaliação de diferentes explantes e combinações de reguladores vegetais (BAP e ANA) no cultivo in vitro de *Physalis pubences* L. **IV Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária - Ciências Agrárias, Animais e Florestais**. 2010.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p.123-130,1999.

BORSATO, Dionísio et al. The simplex-centroid design applied to study of the kinetics of the oxidation of B100 biodiesel in blend with synthetic antioxidants. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1726-1731, 2010.

BOSSO, A.; GUAITA, M.; PETROZZIELLO, M. Influence of solvents on the composition of condensed tannins in grape pomace seed extracts. **Food Chemistry**, v. 207, p.162-169, 2016.

BOURDY, G. et al. Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 2, p.87-109, 2000.

CANTÍN, C. M.; FIDELIBUS, M. W.; CRISOSTO, C. H. Application of abscisic acid (ABA) at veraison advanced red color development and maintained postharvest quality of 'Crimson Seedless' grapes. **Postharvest Biology And Technology**, v. 46, n. 3, p.237-241, 2007.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. 6 ed. 2001. 1044 p.

CHEMAT, F.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.

CHOI, E.; HWANG, J. Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 171-175, 2003.

DIAS, F. S. et al. Direct determination of phenolic acids and hydroxymethylfurfural in wines elaborated in Vale do São Francisco region-Brazil by HPLC DAD. **Analytical Methods** (Print), v. 9, p. 643-648, 2017.

DIAS, F. S.; SILVA, M. F.; DAVID, J. M. Determination of Quercetin, Gallic Acid, Resveratrol, Catechin and Malvidin in Brazilian Wines Elaborated in the Vale do São Francisco Using Liquid-Liquid Extraction Assisted by Ultrasound and GC-MS. **Food Analytical Methods** (Print), v. 6, p. 963-968, 2013.

DIAS, F. S. et al . Optimization and validation of a method for the direct determination of catechin and epicatechin in red wines by HPLC/fluorescence. **Microchemical Journal** (Print), v. 96, p. 17-20, 2010.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados. **Brazilian Journal Of Food Technology**, v. 14, n. 03, p.181-201, 2011.

GARDIN, J. P. P. et al. Ácido abscísico e Etefom: influência sobre a maturação e qualidade das uvas Cabernet Sauvignon. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 2, p.321-327, 2012.

GOMES, T. et al. Optimization of mead production using response surface methodology. **Food and chemical toxicology**, v. 59, p. 680-686, 2013.

GÓRNAZ, P. et al. Phenolic compounds in different fruit parts of crab apple: Dihydrochalcones as promising quality markers of industrial apple pomace by-products. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 607-612, 2015.

GUIMARÃES, E. T. et al. Effects of seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., Solanaceae, on the viability of Leishmania sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p.945-949, 2010.

HANDA, C. L. et al. Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. **Food Chemistry**, v. 197, p.175-184, 2016.

HE, B. et al. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. **Food Chemistry**, v. 204, p.70-76, 2016.

HINNEBURG, I. et al. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p.122-129, 2006.

HUANG, Y. et al. The effects of GA and ABA treatments on metabolite profile of germinating barley. **Food Chemistry**, v. 192, p.928-933, 2016

KARIMI, R.; ERSHADI, A. Role of exogenous abscisic acid in adapting of 'Sultana' grapevine to low-temperature stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 8, p.1-11, 2015.

KOYAMA, R. et al. Épocas de aplicação e concentrações de ácido abscísico no incremento da cor da uva 'Isabel'. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p.1697-1706, 2014.

KUSUMANINGTYAS, R.; LAILY, N.; LIMANDHA, P. Potential of Ciplukan (*Physalis Angulata* L.) as Source of Functional Ingredient. **Procedia Chemistry**, v. 14, p.367-372, 2015.

JAMALIAN, S.; GHOLAMI, M.; ESNA – ASHARI, M. Abscisic acid – mediated leaf phenolic compounds, plant growth and yield is strawberry under different salt stress regimes. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v.25, n. 4, p. 291-299, 2013.

JIANG, Y.; JOYCE, D. C. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. **Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 171–174, 2003.

LACAMPAGNE, S.; GAGNÉ, S.; GÉNY, L. Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: new elements regarding the regulation of tannin composition and leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 29, n. 1, p. 81-90, 2010.

LIAZID, A. Desarrollo de métodos de determinación de compuestos fenólicos. Tese de la Universidad de Cádiz. Puerto Real, Espanha, 2008.

LIGARRETO, G.; LOBO, M.; CORREA, A. Recursos genéticos del género *Physalis* en Colombia. **Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva**, p. 9-27, 2005.

LIMA, C. S. M. et al. Características físico-químicas de *physalis* em diferentes colorações do cálice e sistemas de condução. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p.1061-1068, 2009.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; LIMA, D. E. S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p.447-450, 2002.

LISSNER, R. A. D.; VELA, H. A. G. Introdução do Cultivo de *Physalis* (*Physalis angulata* L.) de Base Agroecológica na Região Central do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, 2009.

LOURENÇO JR., V., CA LOPE & A. REIS. Rotação e sucessão de culturas em hortaliças cultivadas em pequenas áreas no manejo de doenças. **Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)**. 2016.

LUSAKIBANZA, M. et al. In vitro and in vivo antimalarial and cytotoxic activity of five plants used in congolese traditional medicine. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p.398-402, 2010.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Lipidology**, v. 16, n. 1, p. 77-84, 2005.

MASON, T. J.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J. P. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 3, n. 3, p. 253-S260, 1996.

MARES, L. E. V. et al. Phenology, agronomic and nutritional potential of three wild husk tomato species (*Physalis*, Solanaceae) from Mexico. **Scientia Horticulturae**, v. 200, p.83-94, 2016.

MENEZES, B. dos S. Atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante de compostos bioativos de cogumelos comestíveis. Tese da: Embrapa Agroenergia. Vitória da Conquista, Brasil, 2017.

MICHALKIEWICZ, A.; BIESAGA, M.; PYRZYNSKA, K. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. **Journal Of Chromatography A**, v. 1187, n. 1-2, p.18-24, 2008.

MIRA, N. V. M. et al. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p.994-1002, 2008.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura brasileira**, v. 27, n. 2, 2009.

MURCIA, G. et al. ABA and GA3 regulate the synthesis of primary and secondary metabolites related to alleviation from biotic and abiotic stresses in grapevine. **Phytochemistry**, v. 135, p.34-52, 2017.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal Of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p.95-111, 2004



NEGIN, B.; MOSHELION, M. The evolution of the role of ABA in the regulation of water-use efficiency: From biochemical mechanisms to stomatal conductance. **Plant Science**, v. 251, p.82-89, 2016.

PACHECO, A. C.; CASTRO, P. R. C.; SOUZA, G. M. Deficiência hídrica e aplicação de ABA nas trocas gasosas e no acúmulo de flavonoides em calêndula (*Calendula officinalis* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 33, n. 2, p.275-281, 2011

PEDROSO, M. P. et al. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC x GC). **Química Nova**, v. 32, n. 2, p.422-430, 2009.

PEIXOTO NETO, P. A. D. S.; CAETANO, L. C. S. **Plantas medicinais: do popular ao científico**. Maceió: Ed UFAL, 2005.

PEREIRA, C. E. et al. Determinação de inibidores da germinação no espermoderma de sementes de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p.306-311, 2002.

**Reflora** - **Herbário** **Virtual**. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/> Acesso em: 05/10/2017.

RIBEIRO, I. M. et al. *Physalis angulata* L. antineoplastic activity, in vitro, evaluation from its stems and fruit capsules. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p.21-23, 2002.

ROCKENBACK, I.I. et al. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.19, p. 271- 276, 2008.

ŞAHIN, S.; ŞAMLI, R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p.595-602, 2013.

SALGADO, E. R.; ARANA, G. V. *Physalis angulata* L (Bolsa Mullaca): A review of its traditional uses, chemistry and pharmacology. **Boletín Latino Americano Caribe Plant Med Aromat**, v. 12, p.431-45, 2013.

SÁNCHEZ, J.; VARGAS, O.; ZAMORA, P. Cultivo Tradicional de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) una especie de tomatillo silvestre de México. In. **XIX Semana Nacional de la Investigación Científica. Avances en la Investigación Científica**. 2008 en el CUBA p.75 -79

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. 6 ed. 2001. 1044 p.

SEVERO, J. et al. Atividade antioxidante e fitoquímicos em frutos de *Physalis peruviana* L.) durante o amadurecimento e o armazenamento. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.16, n.1-4, p.77-82, 2010.

SILVA, K. N.; AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p.344-351, 2005.

SILVA, D. F. et al. Light spectrum on the quality of fruits of physalis species in subtropical area. **Bragantia**, Campinas, v. 75, n. 3, p.371-376, 2016.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SOARES, M. et al. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p.727-732, 2008.

SOUZA, C. L. M. et al. Morfologia de sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Physalis angulata* L. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 4, p.1082-1085, 2010.

SOUZA, N. K. R.; ALCÂNTARA JUNIOR, J. P.; AMORIM, S. M. C. Efeito do estresse salino sobre a produção de fitomassa em *Physalis angulata* L. (Solanaceae). **Revista Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 4, p. 379-384, 2007.

SOUZA, M. O.; SOUZA, C. L. M.; PELACANI, C. R. Germinação de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas e crescimento inicial de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) em ambientes salinos. **Acta Botanica Brasilica**, v.25, n.1, p.105-112, 2011.

SPENCER, J. P. E. et al. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. **British Journal Of Nutrition**, v. 99, n. 1, p.12-22, 2007.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal Of Separation Science**, v. 30, n. 18, p.3268-3295, 2007.

SUSLICK, K. S.; G. J. P. Applications of ultrasound to materials chemistry. **Annual Review of Materials Science**, v. 29, n. 1, p. 295-326, 1999.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Porto Alegre: Ardmed, 6 ed. 2017. 858 p.

TAO, Y. et al. Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: Modeling, optimization and stability of extracts during storage. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 2, p.706-715, 2014.

TAVARES, M. d. P. Z. et al. *Physalis* and physaloids: A recent and complex evolutionary history. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, v. 100, p.41-50, 2016.

TEODORO, M. T. F. et al. Determination of copper total and speciation in food samples by flame atomic absorption spectrometry in association with solid-phase extraction with bamboo (*Bambusa vulgaris*) fiber loaded with bathocuproine. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 351-357, 2017.

TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TUKUN, A. B. et al. Antioxidant capacity and total phenolic contents in hydrophilic extracts of selected Bangladeshi medicinal plants. **Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine**, v. 7, p.568-573, 2014.

VASCONCELOS, G. R.; ALVES, A. L. H.; LIMA, M. H. In: El-Hani & Videira. O que é vida? Para entender a biologia do século XXI. Rio de Janeiro: Relume Dumará, 2000, p. 209-231

VELASCO, M. C. et al. Phenolic profiles and antioxidant properties of *Physalis angulata* L. as quality indicators. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v.5, n.2, p.114-128, 2017.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, E. L. et al. **Manual de Fisiologia Vegetal**. São Luis: EDUFMA, 2010. 186 p.

WU, H. et al. Simultaneous determination of phenolic acids and 2, 4-dihydroxy-7-methoxy-1, 4-benzoxazin-3-one in wheat (*Triticum aestivum* L.) by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 864, n.2, p. 315-321, 1999.

WU, H. et al. Allelochemicals in Wheat (*Triticum A estivum* L.): Variation of Phenolic Acids in Root Tissues. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.48, n.11, p.5321-5325, 2000.

WU, S. et al. Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *P. peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells. **Life Sciences**, v. 74, n. 16, p.2061-2073, 2004.

WU, S. et al. Antioxidant Activities of *Physalis peruviana*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 6, p.963-966, 2005.

ZENY, B.; TROJAN, D. G. Hormônios de plantas: uma prospecção sobre suas descobertas e aplicações. **Revista TechnoEng** , v.1, n.11, p. 2178-3586, 2016

ZIELINSKI, A. A. F. Avaliação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante in vitro de chás: classificação, modelagem e otimização por técnicas quimiométricas. Tese da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil, 2015.

ZHOU, J. et al. Protective effect of chlorogenic acid on lipid peroxidation induced in the liver of rats by carbon tetrachloride or 60 Co-irradiation. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v.15, n.2, p.119-125, 1993.

## ARTIGO 1

### OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM *PHYSALIS ANGULATA* E DETERMINAÇÃO POR HPLC-DAD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico *Microchemical Journal*, em versão na língua inglesa.

## Otimização da extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos em *Physalis angulata* e determinação por HPLC-DAD

**Resumo:** O procedimento de extração de compostos fenólicos utilizando ultrassom é afetado por muitas variáveis. Para otimizar o processo e ter uma extração mais eficiente do ácido cafeico, rutina, catequina e ácido *trans*-cinâmico em plantas de *Physalis angulata*, foi realizado um planejamento de mistura para encontrar a melhor composição da solução extratora utilizando água, metanol e etanol. As variáveis volume do solvente, tempo de sonicação e temperatura foi otimizada utilizando a matriz Doehlert para os compostos fenólicos totais. A melhor composição de mistura foi 57% de água, 35% de etanol e 8% de metanol e as melhores condições experimentais foram 15 mL de solução extratora e 10 minutos de sonicação. A temperatura não interferiu neste processo. Para separar e quantificar os compostos encontrados nas amostras foi utilizado a cromatografia líquida CLAE. A concentração da catequina variou de 15,5 a 25,5  $\mu\text{g g}^{-1}$ , da rutina entre 75,6 a 88,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ , do ácido cafeico de 25,0 a 32,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  e do transcinâmico 23,5 a 110,7  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

**Palavras chave:** Metabólitos secundários, planejamento de mistura, Matriz de Doehlert

## **Optimization of ultrasonic assisted extraction of phenolic compounds in *Physalis angulata* and determination by HPLC-DAD**

**Abstract:** The extraction procedure of phenolic compounds using ultrasound is affected by many variables. To optimize the process and have a more efficient extraction of caffeic acid, rutin, catechin and transcinnamic in plants of *Physalis angulata*, a mixture planning was carried out to find the best extractant composition using water, methanol and ethanol. The variables solvent volume, sonication time and temperature were optimized using the Doehlert matrix for the total phenolic compounds. The best mixing composition was 57% water, 35% ethanol and 8% methanol and the best experimental conditions were 15 mL of extractive solution and 10 minutes of sonication. The temperature did not interfere in this process. The content of total phenolic compounds found in the samples was up to X GAE. To separate and quantify the compounds found in the samples, HPLC - DAD liquid chromatography was used. The catechin concentration varied from 15.5 to 25.5  $\mu\text{g g}^{-1}$ , the rutin from 75.6 to 88.2  $\mu\text{g g}^{-1}$ , of caffeic acid from 25.0 to 32.5  $\mu\text{g g}^{-1}$  and the transcinnamate from 23.5 to 110.7  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

**Keywords:** Secondary metabolites, mixture planning, Doehlert matrix.

## INTRODUÇÃO

Para sobreviver às condições adversas, as plantas sintetizam os metabólitos secundários, entre eles os compostos fenólicos, que se caracterizam por apresentarem um anel aromático, ligado a uma ou mais hidroxilas, sendo os mais comuns os ácidos fenólicos e flavonoides (YANG et al., 2001; FINCO et al., 2012; ABREU et al., 2017). Atualmente é possível encontrar estudos que atribuem aos compostos fenólicos propriedades terapêuticas que conferem ação anti-inflamatória, anticancerígena, redução à incidência de doenças coronárias. Além disso, podem melhorar o sistema imunológico, regular a expressão gênica, a sinalização celular, o metabolismo de hormônios e influenciar na proliferação de células coronárias (BOGANI et al., 2007; FINCO et al., 2012)

Os compostos fenólicos também são conhecidos por ser fonte natural de antioxidantes, auxiliando no tratamento de muitas doenças, pois protege o corpo contra os radicais livres. Portanto, eles podem ser consumidos em vegetais e frutas, contribuindo para saúde humana ou podem ser adicionados em alimentos para evitar sua deterioração durante o processamento ou armazenamento (BALASUNDRAM, SUNDRAM & SAMMAN, 2006; HINNEBURG, DORMAN & HILTUNEN, 2006; CARVALHO et al., 2014).

Para a utilização de extratos vegetais em formulações de produtos alimentícios é preciso levar em consideração a toxicidade dos extratos e a eficiência da extração nas amostras vegetais, pois o solvente e as técnicas utilizadas para extrair o analito vão interferir significativamente na composição e no rendimento do extrato obtido (BALASUNDRAM, SUNDRAM & SAMMAN, 2006; MAISUTHISAKUL, SUTTAJIT & PONGSAWATMANIT, 2007; CARNIEL et al., 2017).

Existem diversos métodos descritos para preparo dos extratos vegetais, visando à quantificação e identificação dos seus constituintes químicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; GOMES et al., 2003 BERNATONIENE et al., 2016). No entanto, apesar de todo progresso relacionado aos estudos químicos de espécies vegetais com o objetivo de obter compostos com propriedades terapêuticas, o método de extração é um processo limitante e a otimização é uma opção viável para quem deseja obter uma extração eficiente (CECHINEL

FILHO; YUNES, 1998; DENG et al., 2017; REZENDE, NOGUEIRA & NARAIN, 2017).

Há diferentes equipamentos que podem melhorar a eficiência da extração, quando comparada à convencional, como o Soxhlet, extração assistida por micro-ondas, extração assistida por ultrassom (LIAZID, 2008). O ultrassom é uma técnica de baixo custo, fácil operação e é bastante aplicada, pois quando comparada à extração convencional, é mais eficiente, isto é, é possível que mais compostos sejam extraídos em menos tempo, pois as cavitações produzidas pelo aparelho atingem a parede celular, favorecendo a penetração dos solventes em materiais celulares e o conteúdo intracelular é liberado significativamente (CORBIN et al., 2015; SINGANUSONG et al., 2015; REZENDE, NOGUEIRA & NARAIN, 2017). Entretanto, deve-se levar em consideração fatores como tempo do ultrassom e temperatura, pois é possível que haja degradação de alguns compostos, caso sejam submetidos a altas temperaturas por longo período.

Na etapa de desenvolvimento de um procedimento de extração faz-se necessário o estudo e otimização das variáveis que podem afetar a eficiência do procedimento analítico, por exemplo, tipo de solvente utilizado, tempo de ultrassom, relação massa/solvente (SAHIN; SAMLI, 2013). A otimização das variáveis que afetam a recuperação do analito pode ser realizado de duas maneiras, uma é utilizando metodologia univariada, que consiste em investigar uma variável por vez, porém demanda tempo e não permite estudar a interação entre as variáveis. A segunda é a multivariada que permite estudar todas as variáveis simultaneamente e apresenta muitas vantagens como redução do número de experimentos, menor consumo de solvente, leva em consideração as interações entre as variáveis e maior eficiência no processo de otimização (BRITO et al., 2003; HANDA et al., 2016; SAHU et al., 2017).

Após a extração, para isolar esses compostos uma das técnicas mais utilizadas é por cromatografia líquida (HPLC) que é fundamentada nas diferentes interações entre o analito e as fases: móvel e estacionária (BRITO et al., 2003; CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; GOMES et al., 2003; PASCHOAL et al., 2008; RAMOS, 2014).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método para extração e quantificação utilizando o ultrassom, seguido por HPLC – DAD em amostras de *Physalis angulata*, Solanaceae.



## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Plantas de *Physalis angulata* L. foram coletadas na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia (12° 40' 12" S; 39° 06' 07" W, altitude 220 m) em fevereiro de 2017. O plantio foi no período de novembro a fevereiro de 2016, em um latossolo amarelo, em campo. As raízes, caule e folhas foram coletados separadamente. O material vegetal foi colocado em estufa a 40°C, até atingir massa constante e, posteriormente, foi triturado em um moinho de facas. Foram armazenados em recipientes de vidro e mantidos no congelador até o uso.

### Instrumentação e reagentes

O etanol e metanol foram adquiridos pela J. T. Baker (Xalostoc, Edo. De Méx., México). O reagente de Folin-Ciocalteu e os padrões de ácido cafeíco, catequina, rutina e ácido *trans*-cinâmico são da Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO, USA). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os cromatogramas foram obtidos a partir de um sistema HPLC (Agilent Technologies®, Califórnia, USA) com detector de arranjo de díodos (DAD) e uma coluna Agilent C18 Analytical® (4,6 x 150mm, 5 µm). Os tubos de ensaio foram sonicados em um banho ultrassônico (Elma Ultrasonic S10H®, F.: 50/ 60 Hz, P.: 90 W, Alemanha).

### Preparo da solução extratora

A seleção dos solventes foi o primeiro passo e, para isso, buscamos na literatura os mais utilizados. Os três solventes escolhidos para comparar a extração de fenólicos foram água, etanol e metanol. Para cada solução, os solventes foram utilizados em proporções variáveis. O planejamento de mistura utilizou o modelo Simplex centroide. As amostras de folha e caule de *P. angulata* L. (0,15 g) foram combinadas com 6 mL de cada solução. Então, foram colocadas para sonicar com ultrassom durante 15 min. O sobrenadante foi separado do resíduo sólido.

### Otimização do procedimento de extração dos compostos fenólicos

A otimização do procedimento de extração proposto foi realizado em três etapas. Na primeira foi utilizado um planejamento de mistura (simplex centroide) para encontrar a melhor composição do solvente extrator para obter máxima

resposta na extração de compostos fenólicos totais em *Physalis angulata*. O planejamento de mistura foi gerado utilizando os componentes puros (etanol, água e metanol). Na segunda etapa foi utilizado um planejamento fatorial completo de dois níveis ( $2^3$ ) para uma avaliação preliminar das variáveis que afetariam de forma significativa a resposta analítica (equivalente em mg de ácido gálico.) As variáveis estudadas foram: a relação solvente/massa, tempo de sonicação e temperatura do solvente. A significância das variáveis, suas interações e seus efeitos foram avaliados utilizando análise do gráfico de Pareto. Na terceira etapa as variáveis que afetaram de forma significativa a resposta analítica foram otimizadas utilizando a matriz de Doehlert com metodologia de superfície de resposta. Para avaliar a performance analítica foram utilizados parâmetros recomendados na literatura, como: linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão (IUPAC).

#### **Determinação dos compostos fenólicos totais**

O teor de fenólicos totais foi determinado por espectrofotometria molecular, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, segundo metodologia proposta por Liazid (2008), com algumas modificações. Alíquota filtrada de cada ensaio (800  $\mu\text{L}$ ) foi misturado com 400  $\mu\text{L}$  de reagente Folin-Ciocalteu e 2,5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20%  $\text{m v}^{-1}$ ). A absorvância foi medida em comprimento de onda a 750 nm utilizando um espectrofotômetro TECNAL®. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em equivalente a mg de ácido gálico  $\text{g}^{-1}$ .

#### **Análise cromatográfica das amostras de *P. angulata***

Rutina, catequina, ácidos cafeico e ácido *trans*-cinâmico foram determinados conforme descrito por Gornáz et al. (2015), adaptado. O extrato foi filtrado através de um filtro de 0,45 mm depois injetado 5  $\mu\text{L}$  no HPLC, A fase estacionária foi uma coluna C18 (4,6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) a uma temperatura de 28°C, usando o monitoramento online simultâneo de comprimento de onda (254, 280, 320, 360 nm). A fase móvel foi constituída por solvente A (metanol) enquanto o solvente B uma mistura de água ultra pura acidificada com ácido acético até concentração final de 5% ( $\text{v v}^{-1}$ ). O gradiente utilizado foi 0-5 min 100% B; 5-13 min 30% B; 13-18 min 20% B; 18-22 min 40% B, a um fluxo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O sinal analítico foi monitorado em 254 nm para rutina, 280 nm para catequina e ácido *trans*-cinâmico e 320 nm para ácido cafeico.

### **Procedimento otimizado de extração por ultrassom**

0,6 g da amostra seca e triturada foi adicionado 15 mL da solução extratora (57% água, 35% etanol, 8% metanol). A suspensão foi sonicada na ultrassom por 10 minutos, filtrada e posteriormente uma alíquota do extrato obtido foi injetado no HPLC.

### **Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistica 6.0 para Windows (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, EUA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Otimização

#### Planejamento de mistura

A eficiência da extração está relacionada com a natureza do solvente utilizado e alguns trabalhos demonstram maior eficiência empregando a mistura de solventes ao invés do componente puro (BOSSO, GUAITA & PETROZZIELLO, 2016). A fim de obter uma mistura de solventes, que pudesse extrair o máximo de compostos fenólicos nas amostras de *Physalis angulata* utilizou-se um planejamento de mistura do tipo simplex centroide com os componentes: água, etanol e metanol, em triplicata. O Planejamento utilizado e a resposta obtida são mostrados na **Tabela 1**. O modelo quadrático foi utilizado para obter a melhor descrição da região experimental crítica. A Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar o modelo quadrático. O modelo não apresenta falta de ajuste ( $p = 0,163 > 0,05$ ).

A equação do modelo quadrático é dada por:  $AS = 0.294(\% \text{ água}) + 0.233(\% \text{ metanol}) + 0.123(\% \text{ etanol}) + 0.708(\% \text{ água})(\% \text{ metanol}) + 0.968(\% \text{ água})(\% \text{ etanol}) + 0.146(\% \text{ metanol})(\% \text{ etanol})$ .

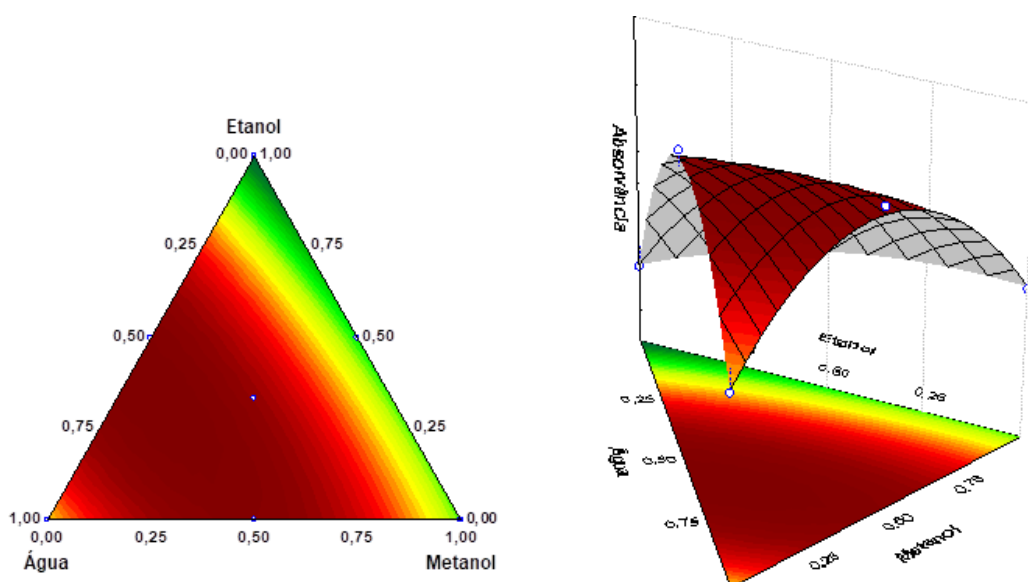
**Tabela 1.** Planejamento de mistura (simplex centroide)

Experimento	Água (%)	Metanol (%)	Etanol (%)	Resposta analítica <sup>a</sup>
1	100	0	0	0,291
2	0	100	0	0,230
3	0	0	100	0,120
4	50	50	0	0,452
5	50	0	50	0,462
6	0	50	50	0,226
7	33,33	33,33	33,33	0,393

<sup>a</sup>Absorvância

A partir da superfície de resposta (**Figura 1 A**) e do gráfico de níveis (**Figura 1 B**) é possível encontrar a proporção ótima para obter o maior nível de extração

dos compostos fenólicos presentes na amostra de *P. angulata*. Diferentes características do solvente podem interferir na extração dos compostos fenólicos vegetais como a viscosidade e a polaridade. A água é um solvente de grande eficiência, pois é uma molécula pequena com capacidade de formar ligações de hidrogênio e estrutura polar, dissolvendo substâncias que contém grupos polares –OH, substâncias iônicas ou grupos –NH<sub>2</sub> (TAIZ et al., 2017). No entanto por possuir alta viscosidade recomenda-se misturas com outros solventes como o etanol, que é considerado como um dos mais adequados para extração de compostos fenólicos em material vegetal (STALIKAS, 2007; SAHIN & SAMLI, 2013). As condições ótimas para extração dos compostos fenólicos na parte aérea de *Physalis angulata* foram 57% água, 35% etanol e 8% metanol.



**Figura 1(A) (B).** Planejamento de mistura Simplex centroid

### Planejamento fatorial

A principal finalidade do planejamento fatorial é estudar a resposta de um sistema analítico que pode sofrer influência das variáveis avaliadas ou das interações entre as mesmas. As variáveis no planejamento são chamadas de fator e níveis são as variações que sofrem cada fator estudado. O planejamento fatorial é utilizado para investigar o efeito das variáveis e suas possíveis interações na resposta analítica, o qual o número de experimentos é calculado pela expressão  $n^K$ , em que  $n$  é o número de níveis a serem estudados e  $K$  o números de fatores. Neste trabalho foram selecionados dois níveis para cada variável estudada.

Utilizou-se o planejamento fatorial completo como etapa preliminar ao procedimento de otimização da extração por ultrassom dos compostos fenólicos presentes nas amostras de *Physalis angulata*, com a finalidade de obter informações sobre as variáveis envolvidas no processo e suas interações.

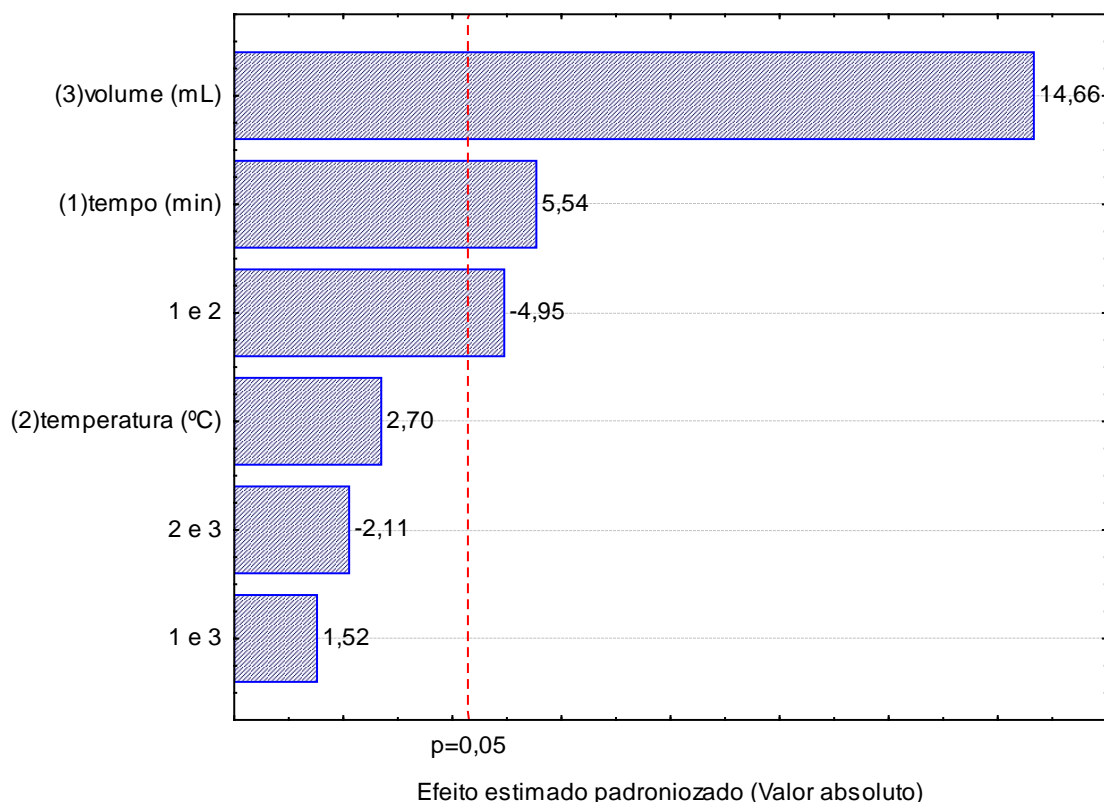
A partir da literatura foram selecionadas algumas variáveis que podem interferir no processo de extração assistida por ultrassom (Tempo de sonicação, temperatura e volume do solvente) (HE et al., 2016; AL-DHABI et al., 2017; DENG et al., 2017). Um planejamento fatorial em dois níveis foi aplicado ( $2^3$ ). Foram realizados 11 experimentos incluindo a triplicada do ponto central. O tempo de ultrassom foi estudado entre 5 a 35 minutos, a temperatura variou de 30° a 70° e o volume do solvente variou de 5 a 15 mL. Os resultados foram expressos em equivalente a ácido gálico (GAE) por g da amostra (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Planejamento fatorial completo de dois níveis ( $2^3$ ) para as variáveis: tempo, temperatura e volume do solvente.

Experimento	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	Resposta <sup>a</sup>
1	5(-)	30 (-)	5 (-)	1,05
2	35 (+)	30 (-)	5 (-)	1,35
3	5 (-)	70 (+)	5 (-)	1,37
4	35 (+)	70 (+)	5 (-)	1,27
5	5 (-)	30 (-)	15 (+)	1,51
6	35 (+)	30 (-)	15 (+)	1,74
7	5 (-)	70 (+)	15 (+)	1,57
8	35 (+)	70 (+)	15 (+)	1,71
9 (C)	20 (0)	50 (0)	10 (0)	1,55
10 (C)	20 (0)	50 (0)	10 (0)	1,57
11 (C)	20 (0)	50 (0)	10 (0)	1,50

<sup>a</sup> Concentração expressa em mg de Ac. Gálico g<sup>-1</sup>

A partir da análise do gráfico de Pareto, observa-se que as variáveis volume do solvente extrator e tempo de sonicação foram que afetaram de forma significativa a resposta analítica dentro do intervalo estudado (Figura 2). E, embora o tempo seja importante para remover o analito da fase sólida para a fase líquida, a relação solvente/massa é a variável que mais interfere na extração dos compostos fenólicos, portanto, no planejamento Doehlert, esta foi otimizada em mais níveis do que a variável tempo.



**Figura 2.** Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo de dois níveis das variáveis volume do solvente, tempo de sonicação e temperatura.

### Planejamento Doehlert

Após os resultados encontrados no fatorial completo de 2 níveis, partiu-se para a otimização das variáveis significativas que afetaram a resposta analítica utilizando o planejamento Doehlert. A matriz de Doehlert permite avaliar uma variável em mais níveis que outra e isso é necessário quando uma variável interfere mais significativamente no processo de extração (BEZERRA, 2005). O planejamento e suas respectivas respostas encontram-se na **Tabela 3**. As equações abaixo ilustram a relação entre as variáveis volume do solvente, tempo de sonicação e concentração dos compostos fenólicos totais, com base em valores reais.

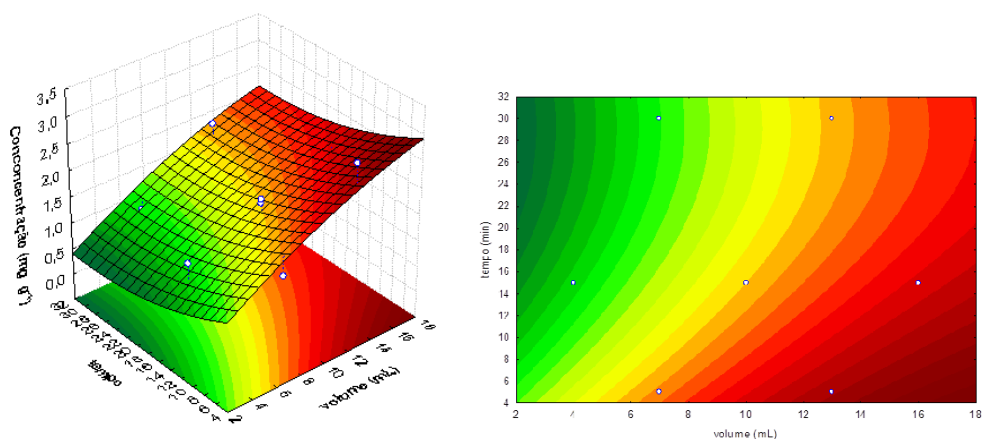
$$\text{TPC} = 1.006 + 0.1825(\text{VE}) - 0.003(\text{VE})^2 - 0.032(\text{ST}) + 0.0003(\text{ST})^2 - 0.0004(\text{VE})(\text{ST}).$$

**Tabela 3.** Planejamento Doehlert para as duas variáveis significativas na extração de compostos fenólicos em *Physalis angulata*.

Experimento	volume (mL)	tempo (min)	conc. (mg AG g <sup>-1</sup> )
-------------	-------------	-------------	--------------------------------

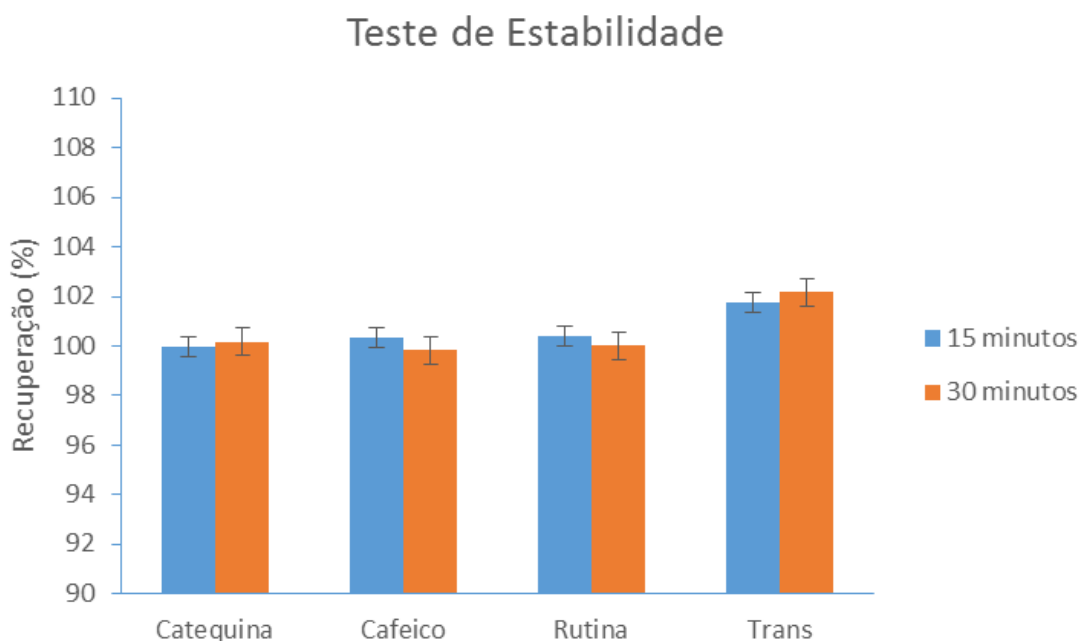
<b>1(C)</b>	0 (10)	0 (30)	1,51
<b>2(C)</b>	0 (10)	0 (30)	1,76
<b>3(C)</b>	0 (10)	0 (30)	1,83
<b>4</b>	1 (16)	0 (30)	1,92
<b>5</b>	0,5 (13)	0,866 (60)	1,95
<b>6</b>	-1 (4)	0 (30)	1,26
<b>7</b>	-0,5 (7)	-0,866 (10)	1,43
<b>8</b>	0,5 (13)	-0,866 (10)	2,89
<b>9</b>	-0,5 (7)	0,866 (60)	0,88

O teste de ANOVA realizado para os resultados encontrados mostram que não houve falta de ajuste para um nível de 96% de confiança. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para ilustrar o efeito da relação massa/solvente e tempo de sonicação na extração (**Figura 3**). O resultado encontrado a partir da inspeção visual demonstra que existem melhores condições experimentais, que foi 15 mL do volume da solução extratora e 10 minutos o tempo de sonicação. O ultrassom favorece a penetração do solvente utilizado, devido às cavitações produzidas a partir de ondas ultrassônicas, melhorando a eficiência da extração (HE et al., 2016). Entretanto, seu uso pode acarretar na degradação de alguns compostos. Para avaliar a estabilidade dos compostos fenólicos, foram sonicadas amostras analíticas, em triplicata, por 15 e 30 minutos. Os resultados mostram que os compostos ácido cafeico, rutina, catequina e ácido *trans*-cinâmico são estáveis durante os tempos estudados (**Figura 4**).





**Figura 3.** Matriz de Dohelert na otimização das variáveis significativas para extração dos composto fenólicos.



**Figura 4.** Teste de estabilidade para os compostos catequina, ácido cafeico, rutina e ácido *trans*-cinâmico em amostras de *Physalis angulata*.

## Validação do método

### Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

É preciso que todas as exigências das aplicações analíticas (limite de quantificação, limite de detecção, exatidão, linearidade, precisão) sejam atendidas para que haja validação do método.

Segundo a resolução da IUPAC (1978) “limite de detecção é a menor quantidade que pode ser diferenciado do sinal de ruído com 95% de confiança., porém não necessariamente quantificado. E o limite de quantificação é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser quantificado com 95% de confiança.

O limite de detecção e quantificação pode ser determinado por diferentes formas (GUIDELINE, 2005). Neste trabalho o limite de detecção e o limite de quantificação foram estabelecidos utilizando a curva de calibração e foram calculados utilizando a equação  $3\sigma/S$  e  $10\sigma/S$ , respectivamente, em que  $\sigma$  é o desvio padrão dos valores de intercepção y e S o valor médio de inclinação das curvas de calibração (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

<b>Analito</b>	<b>LD (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LQ(mg L<sup>-1</sup>)</b>
Catequina	0,03	0,1
Ácido cafeico	0,006	0,021
Rutina	0,01	0,035
Ácido transcinâmico	0,005	0,018

### **Exatidão**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados ao valor verdadeiro. Estes resultados são calculados pela diferença entre o valor da concentração considerado como verdadeiro e o valor experimental, obedecendo aos intervalos de confiança. A exatidão foi avaliada pelo teste de adição e recuperação

### **Adição e recuperação**

Neste ensaio se adicionam diferentes concentrações do analito na amostra para avaliar principalmente o efeito da matriz da amostra nos resultados analíticos (BRITO et al., 2003). As recuperações do teste foram realizadas adicionando os padrões nas concentrações propostas no método. Para calcular as porcentagens de recuperação, foi utilizada a seguinte equação:  $R(\%) = (C_s - C_o) / C_{add} \times 100$ , em que  $C_s$  é a concentração do analito na amostra e mais o valor adicionado,  $C_o$  é a concentração do analito na amostra e  $C_{add}$  é o quantidade de analito que foi adicionado a amostra. Os resultados encontrados variam entre 98% a 106%, demonstrando que houve boa recuperação para o método proposto (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Teste de adição/recuperação para concentrações de catequina, ácido cafeico, rutina, *trans*-cinâmico em *Physalis angulata* por HPLC DAD.

### RSD (interday/ intraday)

A precisão foi expressa pelo desvio padrão relativo que foram calculados

Analito	Add, $\mu\text{g L}^{-1}$	Encontrado, $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperação, %
Catequina	0.0	0,9	
	5.0	5,8	98
	10	10,7	98
Ácido cafeíco	0,0	1,4	
	5,0	6,3	98
	10	11,8	104
Rutina	0,0	3,1	
	5,0	8,1	100
	10	13,7	106
Transcinâmico	0,0	0,9	
	5,0	5,8	98
	10	11,2	103

com base nos resultados de dez repetições em duas concentrações diferentes do analito. Os desvios-padrão relativos encontrados para todos os analitos foram inferiores a 3,0% (Tabela 6).

**Tabela 6.** Os desvios-padrão relativos intraday e interday.

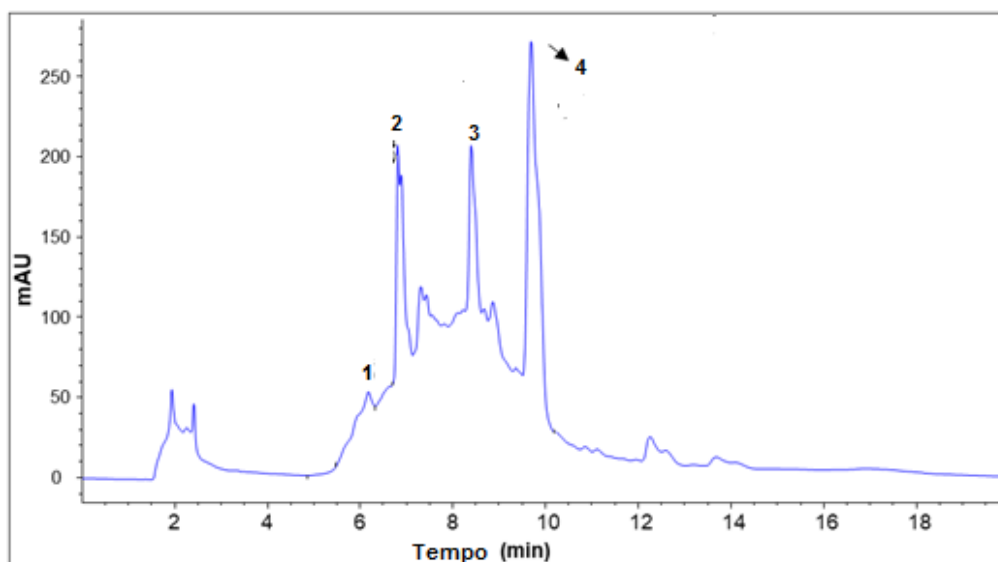
Analito	Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ )	R.S.D (intra-day)	R.S.D (inter-day)
Catequina	2,0	1,94	2,12
	20	0,60	1,15
Ácido cafeíco	2,8	1,05	2,39
	28	0,40	1,98
Rutina	1,5	2,08	2,76
	15	1,45	1,70
Trans-cinâmico	2,1	1,25	1,55
	21	1,73	2,09

### Linearidade

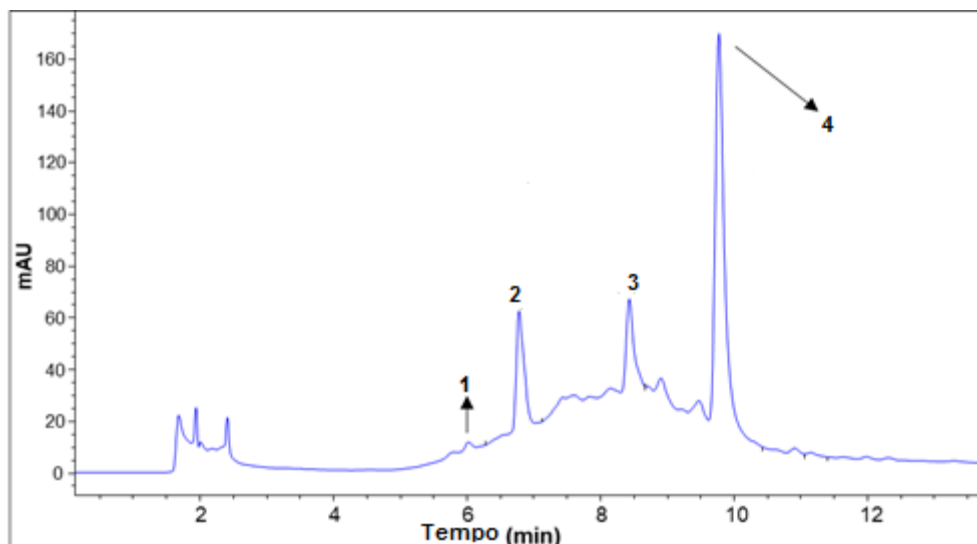
A linearidade é a habilidade que o método tem de produzir resultados que são diretamente proporcionais à concentração da espécie de interesse, dentro de uma variação determinada. As curvas analíticas foram realizadas usando soluções padrão e exibindo comportamento linear em relação ao intervalo de concentração com coeficiente de correlação acima de 0,9986.

### Aplicação

A rutina, catequina, ácido cafeíco e ácido *trans*-cinâmico foram identificados comparando o tempo de retenção e espectro UV-visível das amostras de *Physalis angulata* (Figura 5) e dos padrões puros (Figura 6).



**Figura 5:** Cromatograma dos compostos fenólicos encontrados em *Physalis angulata*. 1: catequina; 2: ácido cafeíco; 3: rutina; 4: ácido *trans*-cinâmico.



**Figura 6:** Cromatograma dos padrões. 1: catequina; 2: ácido cafeíco; 3: rutina; 4: ácido *trans*-cinâmico.

O propósito deste método foi quantificar a rutina, catequina, ácido cafeíco e ácido *trans*-cinâmico em amostras de *Physalis angulata* cultivadas em Cruz das Almas, Bahia. Os resultados encontrados são mostrados na **tabela 7**.

**Tabela 7.** Concentração de ácido cafeíco, rutina, catequina e ácido *trans*-cinâmico em parte aérea de *Physalis angulata*

	Catequina	Ácido cafeico	Rutina	Ácido <i>Trans</i> -cinâmico
Physalis 1	16,7 ± 0,3	25,7±0,2	86,6±1,7	89,2±1,2
Physalis 2	22,5±0,4	25,0±0,2	85,1±1,0	90,2±0,7
Physalis 3	15,5±0,2	25,6±0,3	75,6±0,8	110,7±0,9
Physalis 4	22,1±0,6	32,5±0,5	88,2±0,9	23,5±0,4

A variação encontrada na concentração destes compostos nas amostras, principalmente do composto ácido *trans*-cinâmico ocorre, pois, a concentração de compostos fenólicos na planta varia em função das condições de crescimento, como o clima, solo, disponibilidade hídrica, suas interações com outros organismos e varia até mesmo de planta para planta, já que cada indivíduo responde de maneira intrínseca às condições de cultivo.

## CONCLUSÃO

O planejamento de Doehlert foi uma ferramenta eficiente para otimização do método analítico utilizando a ultrassom para extração e quantificação de 4 compostos fenólicos (catequina, ácido cafeico, rutina e ácido *trans*-cinâmico) presentes em amostras de *Physalis angulata*. Trata-se de um procedimento de extração simples e confiável e o método caracteriza-se pela precisão e linearidade. Como a matriz da amostra sofre influência do ambiente, pode ser necessário otimizar a solução extratora para cada condição que ela é cultivada. A água, etanol e metanol demonstraram ser eficiente na extração de compostos fenólicos de *Physalis angulata*, em diferentes proporções, sendo a mais abundante o solvente água. As condições ótimas para extrair os compostos fenólicos são razão solvente/massa 25, sonicando por 10 minutos. A temperatura não interferiu neste processo.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, C. B. et al. Growth and Evaluation of Phenolic Compounds in *Physalis angulata* L. at Two Different Periods in the Bahia Recôncavo, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 10, p. 145, 2017.
- AL-DHABI, N. A.; PONMURUGAN, K.; JEGANATHAN, P. M. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 34, p. 206-213, 2017.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.
- BERNATONIENE, J. et al. Novel approaches to optimize extraction processes of ursolic, oleanolic and rosmarinic acids from *Rosmarinus officinalis* leaves. **Industrial Crops And Products**, v. 84, p.72-79, 2016.
- BEZERRA, M. A. Aplicação de matriz de Doehlert na otimização de um sistema de pré-concentração em linha para determinação de cobre usando Espectrometria de absorção atômica com chama. Tese da Universidade Federal da Bahia. Salvador, Brasil, 2003.
- BOGANI, P. et al. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. **Atherosclerosis**, v. 190, p. 181–186, 2007.
- BOSSO, A.; GUAITA, M.; PETROZZIELLO, M. Influence of solvents on the composition of condensed tannins in grape pomace seed extracts. **Food Chemistry**, v. 207, p.162-169, 2016.
- BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003.
- CARNIEL, N. et al. Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Acids and Flavonoids from *Physalis angulata*. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 3, 2017.
- CARVALHO, A. V. et al. Mudanças nos compostos bioativos e atividade antioxidante de pimentas da região amazônica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 4, 2014.
- CORBIN, C. et al. Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. **Ultrason Sonochem**, v. 26, p. 176-185, 2015.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p.99-105, 1998.
- DENG, J. et al. Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p.328-334, 2017.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.

FINCO, F. D. B. A. et al. Antioxidant activity and characterization of phenolic compounds from bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.) fruit by HPLC-DAD-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 31, p. 7665-7673, 2012.

GOMES, E. B. et al. A rapid method for determination of some phenolic acids in Brazilian Tropical Fruits of Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) and Umbu (*Spondias Tuberosa* Arruda Camara) by UPLC. **Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation**, v. 3, p. 1-10, 2013.

GÓRNAZ, P. et al. Phenolic compounds in different fruit parts of crab apple: Dihydrochalcones as promising quality markers of industrial apple pomace by-products. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 607-612, 2015.

GUIDELINE, ICH Harmonized Tripartite et al. Validation of analytical procedures: text and methodology. **Q2 (R1)**, v. 1, 2005.

HANDA, C. L. et al. Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. **Food Chemistry**, v. 197, p.175-184, 2016.

HE, B. et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. **Food chemistry**, v. 204, p. 70-76, 2016.

HINNEBURG, I. et al. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p.122-129, 2006.

HOWARD, L. R. et al. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 48, n. 5, p. 1713-1720, 2000.

IUPAC, Analytical Chemistry Division, *Spectrochimica Acta Part B*, 33 (1978) 242.

KUSUMANINGTYAS, R.; LAILY, N.; LIMANDHA, P. Potential of Ciplukan (*Physalis Angulata* L.) as Source of Functional Ingredient. **Procedia Chemistry**, v. 14, p.367-372, 2015.

LIAZID, A. Desarrollo de métodos de determinación de compuestos fenólicos. Tese de la Universidad de Cádiz. Puerto Real, Espanha, 2008.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1409-1418, 2007.



PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v.31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

RAMOS, R. R. Desenvolvimento de uma metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para análise sara de petróleo. Dissertação da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil, 2014.

REZENDE, Y. R. R. S.; NOGUEIRA, J. P.; NARAIN, N. Comparison and optimization of conventional and ultrasound assisted extraction for bioactive compounds and antioxidant activity from agro-industrial acerola (*Malpighia emarginata* DC) residue. **LWT-Food Science and Technology**, v. 85, p. 158-169, 2017.

ŞAHİN, S.; ŞAMLI, R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p.595-602, 2013.

SAHU, P. K. et al. An Overview of Experimental Designs in HPLC Method Development and Validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 590-611, 2017.

SINGANUSONG, R. et al. Low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) and lime (*Citrus aurantifolia*) peels and the antioxidant. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 5, p. 1112-1123, 2015.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal Of Separation Science**, v. 30, n. 18, p.3268-3295, 2007.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Porto Alegre: Ardméd, 6 ed. 2017. 858 p.

Yang, C. S.; Landau, J. M.; Huang, M. T.; Newmark, H. L. Inhibition of Carcinogenesis by Dietary Polyphenolic Compounds. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 21, p. 381–406, 2001.

## ARTIGO 2

### APLICAÇÃO DE ABA NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM *Physalis angulata*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* em versão na língua inglesa

## **Aplicação de ABA na produção de compostos fenólicos em *Physalis angulata***

**RESUMO:** No presente trabalho foi avaliada a influência da aplicação de diferentes concentrações de ácido abscísico (ABA) na composição de compostos fenólicos na parte aérea de *Physalis angulata*. O experimento foi instalado em casa de vegetação em Cruz das Almas, Bahia, com plantas envasadas. Aos 40 dias as plantas foram separadas em grupos e foram aplicados os seguintes tratamentos: 0, 25, 50, 100 e 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Após 4 dias, as plantas foram coletadas e colocadas na estufa até atingir massa seca constante. Os fenólicos totais foram determinados por espectrofotometria, utilizando o reagente Fólín-Ciocalteu. A determinação de ácido cafeico, rutina e *trans*-cinâmico foi feita utilizando HPLC-DAD. A aplicação de ABA aumenta a síntese dos compostos fenólicos totais até a concentração 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Acima disso, o ABA foi desativado pela planta para evitar a senescência. A aplicação de ABA não interfere na síntese de ácido cafeico. Entretanto, a concentração da rutina aumenta independente da concentração de ABA que foi aplicado e para o ácido *trans*-cinâmico, houve um aumento até a concentração de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

**Palavras-chave:** regulador vegetal, planta medicinal, fenóis.

## **Application of ABA in the production of phenolic compounds in *Physalis angulata***

**ABSTRACT:** In the present work the influence of the application of different concentrations of abscisic acid (ABA) on the composition of phenolic compounds in the aerial part of *Physalis angulata* was evaluated. The experiment was installed in a greenhouse in Cruz das Almas, Bahia, with bottled plants. At 40 days the plants were separated into groups and the following treatments were applied: 0, 25, 50, 100 and 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . After 4 days, the plants were collected and placed in the oven until reaching constant dry mass. Total phenolics were determined by spectrophotometry using the Folin-Ciocalteu reagent. The determination of caffeic, rutin and trans-cinnamic acid was done using HPLC-DAD. The application of ABA increased the synthesis of the total phenolic compounds up to the concentration 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Above this, the ABA was deactivated by the plant to avoid senescence. The application of ABA did not interfere with the synthesis of caffeic acid. However, the rutin concentration increased regardless of the concentration of ABA that was applied and for the trans-cinnamic acid, there was an increase up to the concentration of 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

**Keywords:** plant regulator, medicinal plant, phenols.

## INTRODUÇÃO

Muitas plantas medicinais como a *Physalis angulata* (Solanaceae) são fontes de fitoquímicos com potencial para tratamento de diversas doenças (HSEU et al., 2011). Distribuída em regiões tropicais e subtropicais, é muito utilizada por comunidades locais na região Nordeste para tratar patologias (SILVA & AGRA, 2005; NOGUEIRA et al., 2013).

Estudos recentes feito com o extrato da planta demonstram que *Physalis angulata* exerce um efeito inibitório sobre o câncer bucal, com grande potencial anti-metastático e anti-angiogênico para o tratamento de inflamação ou câncer. Além disso, pode ser uma nova opção para o tratamento da leshimaniose cutânea, com possibilidades de comercialização de seu extrato para indústria de cosméticos (HSEU et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2013).

Entre os compostos bioativos que compõem o extrato da *Physalis angulata*, estão os compostos fenólicos, que são uma classe de substâncias produzidas em espécies vegetais, como um mecanismo de defesa bioquímico contra fatores ambientais e bióticos adversos (VIZZOTTO, KROLOW & WEBER, 2010; MANZI et al., 2016; VELASCO et al., 2017). Se nas plantas desempenham papel de defesa, para os seres humanos auxiliam na prevenção de diversas doenças e, por isso, muitos autores sugerem que o consumo de alimentos que contêm compostos fenólicos pode contribuir para a saúde humana (BOGANI et al., 2007; NASZK & SHAHIDI, 2004; WU et al., 2004; TUKUN et al., 2014). Além dos benefícios à saúde, eles podem ser adicionados aos alimentos a fim de evitar a deterioração durante o processamento ou armazenamento devido à sua propriedade antioxidante (HINNEBURG et al., 2005).

Com todas as vantagens atribuídas aos compostos fenólicos, eles vêm recebendo atenção entre os nutricionistas, pesquisadores e, principalmente, entre os consumidores (TUKUN et al., 2014). Portanto as pesquisas estão sendo direcionadas para identificação e quantificação destes compostos em diferentes espécies vegetais (DRANCA & OROIAN, 2016; HE et al., 2016; RASHED et al., 2016)

Na literatura, já existem estudos sobre a composição fenólica da parte aérea e frutos das plantas do gênero *Physalis* (SEVERO et al., 2010; CARNIEL et al., 2017; VELASCO et al., 2017). Entretanto, até o momento não é conhecida

pesquisas que foram realizadas com aplicação de reguladores visando produção de compostos fenólicos em *Physalis angulata*.

Uma estratégia para induzir a produção de compostos fenólicos nas mais diversas espécies vegetais é a aplicação exógena de ABA por meio de pulverização na parte aérea da planta. Enquanto o ABA endógeno define o estado de trocas gasosas e fotossíntese, retardam ou inibem o desenvolvimento de órgãos, provocam o fechamento estomático, contribuem para que as plantas possam lidar com condições de estresse, o ABA exógeno pode interferir na síntese de enzimas que alteram significativamente o metabolismo primário e secundário da planta, podendo induzir a um aumento na síntese de compostos fenólicos (HLAVINKA et al., 2012; HUANG et al., 2016; MURCIA et al., 2017; VIEIRA et al., 2010).

Na literatura são reportados alguns trabalhos que versam sobre a aplicação do ABA visando a produção dos metabólitos secundários de diferentes partes da planta (JIANG & JOYCE, 2003; GARDIN et al., 2012; KOYAMA et al., 2014). Entretanto, sua aplicação nem sempre tem efeito imediato, sendo necessários testes com as espécies vegetais visto que os efeitos são inerentes a cada espécie ou cultivar (HUANG et al.; NEGIN & MOCHELION, 2016).

Embora existam muitos estudos em todo o mundo sobre o metabolismo da planta regulado pelas condições ambientais, o conhecimento sobre o efeito da aplicação de reguladores em plantas medicinais ainda é escasso (LIMA, MELO & LIMA, 2002; BAYDAR & BAYDAR, 2013; BEREZINA, BRIKINA & VESELOW, 2017). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição fenólica de *P. angulata* submetida a diferentes concentrações de ABA.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## Material vegetal e condições experimentais

O experimento foi realizado na área experimental do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia. Em vasos de polietileno preenchidos com 5 dm<sup>3</sup> de solo, foram semeadas 10 sementes de *Physalis angulata* por vaso a uma profundidade de 0,5 cm. Após 10 dias foi feito o desbaste deixando uma planta por vaso. Durante todo o período os vasos foram irrigados diariamente e o controle de plantas invasoras realizadas manualmente. O solo coletado foi da área experimental da UFRB, Cruz das Almas- Bahia e a análise química do solo foi realizada pelo Laboratório de Análise de Solo, Água e Plantas cujo pH: 6,2; P (mg/dm<sup>3</sup>): 3,7; K(mg/dm<sup>3</sup>): 27,4; Ca<sup>2+</sup>(cmol(c)/dm<sup>3</sup>): 2,6; Mg<sup>2+</sup>(cmol(c)/dm<sup>3</sup>): 1,2; Al<sup>3+</sup>(cmol(c)/dm<sup>3</sup>): 0; H + Al: 0,8.

As soluções foram preparadas em meio surfactante 0,05% (v / v) Triton X-100 no período da manhã. Aos 40 dias após a semeadura, as plantas foram separadas em grupo e as soluções foram pulverizadas com o pulverizador manual em toda planta (folhas e caule) até o escoamento, na parte abaxial e adaxial, nas seguintes concentrações: 25, 50, 100 e 150 µmolL<sup>-1</sup>, com 5 repetições, cada repetição com 3 plantas, mais o tratamento com aplicação da solução sem o ABA, como testemunha. A pulverização foi realizada no turno da noite para evitar a fotodegradação. No 4° DAP (dias após a aplicação) do ABA as plantas começaram a apresentar os sintomas de senescência, então elas foram coletadas, levadas para estufa a 40°C onde ficaram até manter massa constante e, posteriormente, foram trituradas em um moinho de facas e armazenados em recipientes de vidro e mantidos no congelador a 4°C até o uso.

## Instrumentação e reagentes

O etanol e metanol foram adquiridos pela J. T. Baker (Xalostoc, Edo. De Méx., México). O reagente de Folin-Ciocalteu e os padrões de ácido cafeico, catequina, rutina e ácido *trans*-cinâmico são da Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO, USA). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os cromatogramas foram obtidos a partir de um sistema HPLC (Agilent Technologies®, Califórnia, USA) com detector de arranjo de díodos (DAD) e uma coluna Agilent C 18 Analytical® (4,6 x 150mm, 5 µm). Os tubos de ensaio foram sonicados em um banho ultrassônico (Elma Ultrasonic S10H®, F.: 50/ 60 Hz, P.: 90 W, Alemanha).

### **Extração dos compostos fenólicos**

Foram pesados 0,6 g de amostra e adicionados 15 mL da solução extratora composta por água, etanol e metanol (57% água, 35% etanol, 8% metanol). As amostras foram sonicadas durante 10 min.

### **Determinação dos compostos fenólicos totais**

O teor de fenólicos totais foi determinado por espectrofotometria molecular, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, segundo metodologia proposta por Liazid (2008), com algumas modificações. Alíquota filtrada de cada ensaio (800  $\mu\text{L}$ ) foi misturado com 400  $\mu\text{L}$  de reagente Folin-Ciocalteu e 2,5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20% m v<sup>-1</sup>). A absorvância foi medida em comprimento de onda de 750 nm utilizando um espectrofotômetro TECNAL®. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos a equivalente a mg de ácido gálico g<sup>-1</sup>.

### **Análise cromatográfica das amostras de *Physalis***

Rutina, ácidos cafeico e ácido *trans*-cinâmico foram determinados conforme descrito por Gornáz et al (2015), adaptado. 1 mL do extrato foi filtrado através de um filtro de 0,45 mm depois injetado 5  $\mu\text{L}$  no HPLC, A fase estacionária foi uma coluna C18 fase reversa (4,6 x 150mm, 5  $\mu\text{m}$ ) a uma temperatura de 28°C, usando o monitoramento online simultâneo de comprimento de onda (254, 280, 320, 360 nm). A fase móvel foi constituída por solvente A (metanol) enquanto o solvente B uma mistura de água ultra pura acidificada com ácido acético até concentração final de 5% (v v<sup>-1</sup>). O gradiente utilizado foi 0-5 min 100% B; 5-13 min 30% B; 13-18 min 20% B; 18-22 min 100% B, a um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. O sinal analítico foi monitorado em 254 nm para rutina, 280 nm para catequina e ácido *trans*-cinâmico e 320 nm para ácido cafeico.

### **Análise estatística**

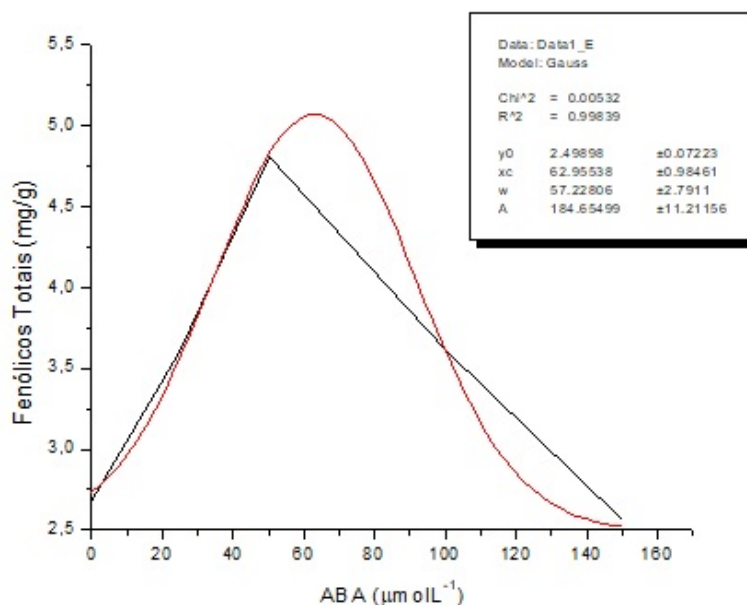
Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro, realizadas com auxílio do aplicativo R Development Core Team (2011).



## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados encontrados a partir da análise estatística confirmam que a aplicação exógena do ABA provoca mudanças na composição fenólica de *Physalis angulata*.

Quando comparado com o controle, observou-se um aumento de até 80% na produção de compostos fenólicos totais em função da aplicação de ABA até a concentração 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 1) (tabela 1).



**Figura 1.** Fenólicos totais em *Physalis angulata* submetida a diferentes concentrações de ABA.

**Tabela 1.** Rendimento dos compostos fenólicos em *Physalis angulata* submetidas à diferentes concentrações de ácido abscísico (ABA) em Cruz das Almas, Ba.

Concentração de ABA	Fenólicos totais ( $\text{mg.g}^{-1}$ )	Ácido cafeíco ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	Rutina ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	Transcinâmico ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )
Testemunha	2,672 B	861,1 A	88,32 B	263,9 B
25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	3,597 B	1171 A	135,5 A	312,2 AB
50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	4,813 A	1127 A	125,7 AB	437 A
100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	3,614 B	1026 A	127,3 AB	368,2 AB
150 $\mu\text{mol L}^{-1}$	2,558 B	1093 A	150,2 A	243,6 B
CV (%)	15,24	14,58	15,80	23,22

Alguns trabalhos relatam a eficiência da aplicação de ABA no aumento dos compostos fenólicos totais (BERLI et al., 2010; GARDIN et al., 2012; JAMALIAN, GHOLAMI & ASHARI, 2013; KARIMI & ERSHADI, 2015). Possivelmente o ABA exógeno sintetiza enzimas que estão relacionadas com a produção de diferentes metabólitos na planta, entre eles, os compostos fenólicos

(HUANG et al., 2016). Além disso, sintetizar compostos fenólicos é um mecanismo de defesa que ajuda às plantas a lidar com condições atípicas do ambiente no quais são cultivadas (JAMALIAN, GHOLAMI & ASHARI, 2013; MURCIA et al., 2017).

A síntese de ABA dentro da planta aumenta em condições adversas, principalmente em condições de estresse hídrico e salino e concentrações extremamente baixas são suficientes para provocar respostas na fisiologia da planta. Concentrações muito altas de ABA exógeno modificam a fisiologia da planta, promovendo rapidamente a senescência (MURCIA et al., 2016; TAIZ et al., 2017). Isso explica porque existe um aumento na concentração de compostos fenólicos totais dentro da planta até  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , mas à medida que aumenta as concentrações de ABA a síntese desses metabólitos vai diminuindo e no tratamento com  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$  a quantidade encontrada é semelhante ao tratamento controle. Como o ABA exógeno induziu a uma condição de estresse, após 4 DAP algumas plantas começaram a apresentar sintomas de senescência, então a *Physalis angulata* desativou a ação do regulador vegetal como tentativa de evitar a senescência. Possivelmente, a síntese das enzimas responsáveis pela produção dos compostos fenólicos diminuiu com a inativação do ABA. Segundo TAIZ et al. (2017) as plantas apresentam diferentes mecanismos para desativação hormonal que são armazenamento, mudanças estruturais, como a conjugação com açúcares ou aminoácidos, degradação ou inativação por oxidação.

Portanto, a aplicação de ABA induz a síntese de compostos fenólicos, mas em concentrações muito altas o ABA é desativado como estratégia de sobrevivência, reduzindo a produção destes metabólitos.

Segundo Severo et al. (2010) e Rockenback et al. (2008) frutos de *Physalis peruviana* apresentam significativo teor de fenólicos totais, enquanto que frutos de *Physalis angulata* apresentaram um dos valores mais baixos quando comparado com outros órgãos da parte aérea (VELASCO et al., 2017). Na parte aérea (caule e folha) a maior concentração de compostos fenólicos encontrados na *Physalis angulata* foi de  $4,8 \text{ mg g}^{-1}$ , em plantas tratadas com  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ABA. Maisuthisakul et al. (2007) classificaram os compostos fenólicos totais presentes em extratos de plantas em três níveis: Baixo: menor que  $10 \text{ mg g}^{-1}$ ; médio: entre  $10$  e  $20 \text{ mg g}^{-1}$ ; alto: maior que  $40 \text{ mg g}^{-1}$ . Segundo essa

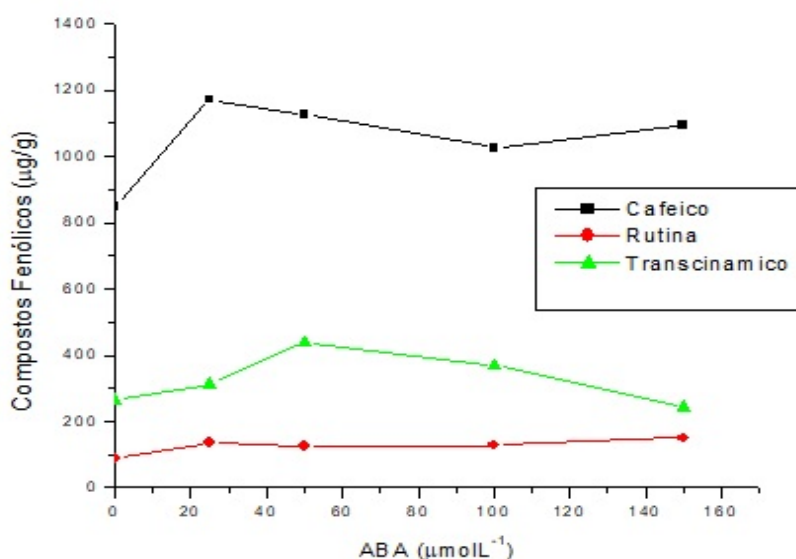
classificação é considerada baixa a concentração de compostos fenólicos totais na parte aérea de *Physalis angulata*. Os valores apresentados neste trabalho estão abaixo dos 5,1 g g<sup>-1</sup> encontrados em plantas da mesma espécie cultivadas por 42 dias, sem nenhum tipo de tratamento (VELASCO et al., 2017). Abreu et al. (2017) encontraram valores entre 5,8 e 9,1 mg g<sup>-1</sup> no conteúdo de compostos fenólicos totais em *Physalis angulata*, em função do período de cultivo. Carniel et al. (2017) encontraram a menor quantidade de compostos fenólicos: 3,7 mg g<sup>-1</sup>. Essa variação apresentada em diferentes amostras da mesma espécie evidencia a influencia que o ambiente exerce na concentração dos compostos fenólicos. Desta forma, a cobertura plástica utilizada neste trabalho possivelmente interferiu de forma decisiva no conteúdo de compostos fenólicos totais, pois reduziu a exposição da planta à radiação UV-B e já foi relatado a importância da radiação solar na síntese desses metabólitos (GARDIN et al., 2012; ABREU et al., 2017).

Para determinação dos compostos fenólicos individuais por HPLC-DAD comparou-se o tempo de retenção e espectro dos padrões com os compostos encontrados nas amostras.

Foram determinados 3 compostos fenólicos: ácido cafeico, rutina e ácido *trans*-cinâmico. Ácido cafeico, rutina, ácido elágico e ácido gálico foram encontrados em amostras de *Physalis angulata* por Carniel et al. (2017). Velasco et al. (2017) afirmam que a *Physalis angulata* é uma fonte importante de kampeferol. Essas diferenças relatadas podem ocorrer por algumas razões. Como já foi dito anteriormente, o ambiente interfere de maneira decisiva na síntese de compostos fenólicos. Normalmente, quando as plantas sofrem algum tipo de estresse, a produção destes metabólitos é maior e as respostas dadas ao estímulo ambiental são inerentes de cada indivíduo, ainda que seja da mesma espécie. As condições experimentais de extração como os solventes e metodologias utilizadas também influenciam nos resultados finais, pois possivelmente cada composto requer uma condição de extração diferente (BERNATONIENE et al., 2016).

O ácido cafeico foi o composto em maior concentração encontrado nas amostras de *P. angulata*. Embora tenha sido constatado um aumento na síntese de ácido cafeico em decorrência da aplicação do ABA, os resultados não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 3). Diferente do que foi relatado por

Jamalian et al. (2013) que demonstraram que a aplicação de ABA foi eficiente para aumentar a concentração de ácido cafeico em amostras de morango.



**Figura 3.** Ácido cafeico, rutina e ácido *trans*-cinâmico em *Physalis angulata* submetida a diferentes concentrações de ABA.

Rutina é um flavonoide amplamente distribuído no reino vegetal, que pode contribuir para o tratamento de diversas patologias, como o câncer e diabetes, por isso é recomendada como um suplemento para prevenir complicações ocasionadas pela doença (BECHO, MACHADO & GUERRA, 2009, GHORBANI, 2017). A aplicação de ABA induziu ao acúmulo de rutina em mais de 70% na *Physalis angulata*, entretanto não houve diferença significativa entre as concentrações testadas.

Observou-se um aumento na síntese de ácido *trans*-cinâmico até a concentração 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Contudo, as maiores concentrações foram nas amostras tratadas com 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ABA, assim como ocorreu para produção dos compostos fenólicos totais.

Embora os compostos fenólicos derivem de duas rotas metabólicas principais: via do ácido mevalônico e via do ácido chiquímico, a síntese de cada composto fenólico ocorre por diferentes rotas metabólicas e depende da ação de diferentes enzimas (VIZZOTO, KROLOW & WEBER, 2010; RODRIGUES et al., 2015). Por esta razão a resposta à aplicação de ABA foi intrínseca a cada um dos compostos estudados.

## CONCLUSÃO

A aplicação de ABA é eficiente para aumentar a síntese de compostos fenólicos em *Physalis angulata* até a concentração de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Acima disso, a planta desativa o regulador vegetal para evitar a senescência. Para a concentração de ácido cafeíco não há diferença entre os tratamentos estudados. Já a síntese de rutina aumenta independente da dose aplicada, enquanto que para o ácido *trans*-cinâmico o ABA é eficiente até a concentração de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , quando comparado com o tratamento testemunha.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. B. et al. Growth and Evaluation of Phenolic Compounds in *Physalis angulata* L. at Two Different Periods in the Bahia Reconcavo, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 10, p. 145, 2017.

BAYDAR, N. G. ; BAYDAR, Hasan. Phenolic compounds, antiradical activity and antioxidant capacity of oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 375-380, 2013.

BECHO, J. R. M.; MACHADO, H; GUERRA, M. O. Rutina–estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 1, n. 1, 2010.

BEREZINA, E. V.; BRILKINA, A. A.; VESELOV, A. P. Content of phenolic compounds, ascorbic acid, and photosynthetic pigments in *Vaccinium macrocarpon* Ait. dependent on seasonal plant development stages and age (the example of introduction in Russia). **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 139-146, 2017.

BERLI, F. J. et al. Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet-absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. **Plant Cell e Environment.**, v.33, p.1-10, 2010.

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

BOGANI, Paola et al. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. **Atherosclerosis**, v. 190, n. 1, p. 181-186, 2007.

CARNIEL, N. et al. Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Acids and Flavonoids from *Physalis angulata*. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 3, 2017.

DRANCA, F.; OROIAN, M. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 31, p. 637-646, 2016.

GARDIN, J. P. P. et al. Ácido abscísico e Etefom: influência sobre a maturação e qualidade das uvas Cabernet Sauvignon. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 2, p.321-327, 2012.

GHORBANI, A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 305-312, 2017.

GÓRNAZ, P. et al. Phenolic compounds in different fruit parts of crab apple: Dihydrochalcones as promising quality markers of industrial apple pomace by-products. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 607-612, 2015.

HE, B., et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. **Food chemistry**, v. 204, p. 70-76, 2016.

HINNEBURG, I. et al. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p.122-129, 2006.

HLAVINKA, J. et al. Jasmonic acid accumulation and systemic photosynthetic and electrical changes in locally burned wild type tomato, ABA-deficient sitiens mutants and sitiens pre-treated by ABA. **Plant Physiology And Biochemistry**, v. 54, p.89-96, 2012.

HSEU, Y. et al. Inhibitory effects of *Physalis angulata* on tumor metastasis and angiogenesis. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p.762-771, 2011.

HUANG, Y. et al. The effects of GA and ABA treatments on metabolite profile of germinating barley. **Food Chemistry**, v. 192, p.928-933, 2016.

JAMALIAN, S.; GHOLAMI, M.; ASHARI, M. E. Abscisic acid – mediated leaf phenolic compounds, plant growth and yield in strawberry under different salt stress regimes. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, n. 4, p.291-299, 2013.

JIANG, Y.; JOYCE, D. C. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. **Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 171–174, 2003.

KARIMI, R.; ERSHADI, A. Role of exogenous abscisic acid in adapting of 'Sultana' grapevine to low-temperatures stress. **Acta Physio Plant**, v. 37, 2015.

KOYAMA, R. et al. Épocas de aplicação e concentrações de ácido abscísico no incremento da cor da uva 'Isabel'. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p.1697-1706, 2014.

LIAZID, A. Desarrollo de métodos de determinación de compuestos fenólicos. Tese de la Universidad de Cádiz. Puerto Real, Espanha, 2008.

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A. & LIMA, D. E. Total phenolics and carotenoids in surinam cherry. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 447-450, 2002.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1409-1418, 2007.

MANZI, M. et al. Root ABA Accumulation in Long-Term Water-Stressed Plants is Sustained by Hormone Transport from Aerial Organs. **Plant And Cell Physiology**, v. 56, n. 12, p.2457-2466, 2015.



MURCIA, G. et al. ABA and GA3 regulate the synthesis of primary and secondary metabolites related to alleviation from biotic and abiotic stresses in grapevine. **Phytochemistry**, v. 135, p.34-52, 2017.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal Of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p.95-111, 2004.

NEGIN, B.; MOSHELION, M. The evolution of the role of ABA in the regulation of water-use efficiency: From biochemical mechanisms to stomatal conductance. **Plant Science**, v. 251, p.82-89, 2016.

NOGUEIRA, R. C. et al. Genotoxicity and antileishmanial activity evaluation of *Physalis angulata* concentrated ethanolic extract. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 36, n. 3, p.1304-1311, 2013.

RASHED, M. M., et al. Effect of ultrasonic treatment on total phenolic extraction from *Lavandula pubescens* and its application in palm olein oil industry. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 29, p. 39-47, 2016.

ROCKENBACK, I.I. et al. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.19, p. 271- 276, 2008.

RODRIGUES, J. L. et al. Heterologous production of caffeic acid from tyrosine in *Escherichia coli*. **Enzyme and microbial technology**, v. 71, p. 36-44, 2015.

SEVERO, J.; Lima, C. S. M.; Coelho, M. T.; Rufatto, A. R.; Rombaldi, C. V.; Silva, J. A. Atividade antioxidante e fitoquímicos em frutos de *Physalis* (*Physalis peruviana* L.) durante o amadurecimento e o armazenamento. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.16, n.1-4, p.77-82, jan-dez, 2010.

SILVA, K. N.; AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p.344-351, 2005.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Porto Alegre: Ardméd, 6 ed. 2017. 858 p.

TUKUN, A. B. et al. Antioxidant capacity and total phenolic contents in hydrophilic extracts of selected Bangladeshi medicinal plants. **Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine**, v. 7, p.568-573, 2014.

VELASCO, M. C. et al. Phenolic profiles and antioxidant properties of *Physalis angulata* L. as quality indicators. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v.5, n.2, p.114-128, 2017.

VIEIRA, E. L. et al. **Manual de Fisiologia Vegetal**. São Luis: EDUFMA, 2010. 186 p.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.R. & WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado- Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

WU, S. et al. Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *P. peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells. **Life Sciences**, v. 74, n. 16, p.2061-2073, 2004.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Foi realizado um estudo sobre a aplicação do regulador vegetal ABA para aumentar a síntese de compostos fenólicos em *Physalis angulata*. E também foi otimizado um método de extração assistida por ultrassom destes compostos fenólicos em amostras da parte aérea.

## **ANEXO**

## ANEXO A

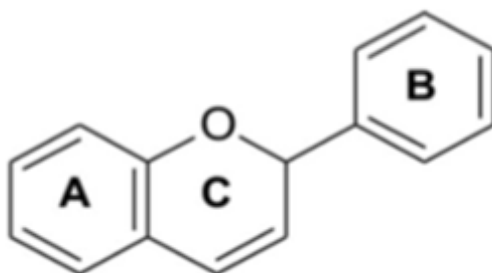


**Figura 1.** Frutos de *Physalis peruviana* (Reflora)



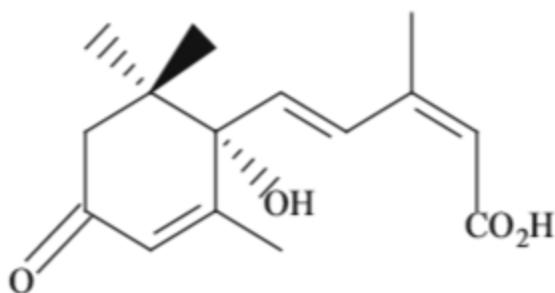
**Figura 2.** *Physalis angulata* L. Foto: Cláudia B. de Abreu.

## ANEXO B



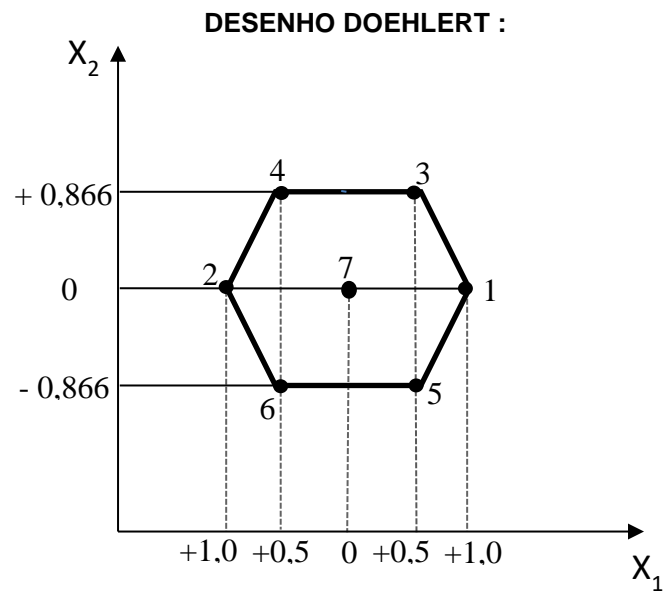
**Figura 3.** Estrutura química dos flavonoides.

## ANEXO C



**Figura 4.** Estrutura do ácido abscísico

## ANEXO D



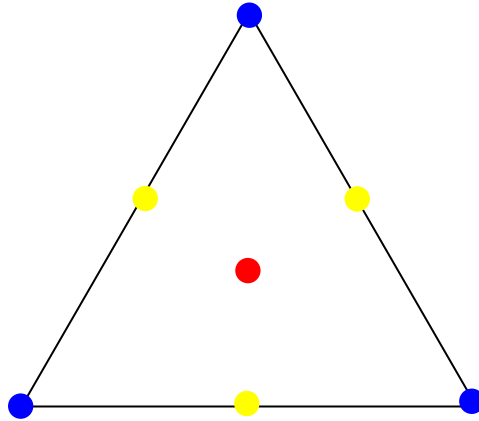
**Figura 6:** Gráfico ilustrando o Planejamento Doehlert para o estudo de duas variáveis em diferentes níveis.

Experimento	X1	X2
1	1	0
2	0,5	0,866
3	-1	0
4	-0,5	-0,866
5	0,5	-0,866
6	-0,5	0,866
7	0	0

**Tabela 2.** Matrix de Doehlert para o estudo de duas variáveis

## ANEXO E

**Figura 7:** Planejamento de mistura (simplex centroide) utilizando 3 solventes.





**Tabela 1.** Procedimentos de extração assistida por ultrassom em amostras vegetais.

Material vegetal	Solvente	Temperatura	Tempo de sonicação	Relação massa/solvente	Mg equivalente a ácido gálico/ g massa seca	Referência
Oliva ( <i>Olea europea</i> L.)	80% metanol	47 °C	30 min	22 mL g <sup>-1</sup>	7,01 mg GAE g <sup>-1</sup>	DENG et al., 2017.
<i>Lavandula pubescens</i>	70% metanol	40 °C	5 min	10 mL g <sup>-1</sup>	253,87 mg GAE g <sup>-1</sup>	RASHED et al., 2016.
<i>Phlomidioschema parviflorum</i>	80% metanol	41,5 °C	49,3 min	35 mL g <sup>-1</sup>	15,4 mg GAE g <sup>-1</sup>	MAJD et al., 2014.
Blueberry ( <i>Vaccinium ashei</i> )	70% etanol	60 °C	25 min	20 mL g <sup>-1</sup>	16,01 mg GAE g <sup>-1</sup>	HE et al., 2016.
Beringela ( <i>Solanum melongena</i> L.)	76,6% metanol	69,4°C	57,5 min	-	29,63 mg GAE g <sup>-1</sup>	DRANCA & OROIAN, 2016
<i>Sparganii rhizoma</i>	75,3% etanol	-	40 min	19,21 mL g <sup>-1</sup>	-	WANG et a., 2013.
Resíduo de pó de café ( <i>Coffea</i> sp.)	100% etanol	40 °C	40 min	17 mL g <sup>-1</sup>	33,84 mg GAE g <sup>-1</sup>	Al-DHABI et al., 2017.
Lichia ( <i>Litchi chinensis</i> Sonn)	70% etanol	60 °C	30 min	-	12,25 mg GAE g <sup>-1</sup>	SILVA et al., 2016

