

**Estudo de quantificação dos compostos fenólicos, avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana da casca do caule do *Croton cajucara* BENTH**

**Study of quantification of phenolic compounds, evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of the stem bark of the *Croton cajucara* BENTH**

**Estudio de cuantificación de compuestos fenólicos, evaluación de actividades antioxidantes y antimicrobianas de la corteza del caule del *Croton cajucara* BENTH**

Recebido: 28/10/2020 | Revisado: 03/11/2020 | Aceito: 06/11/2020 | Publicado: 11/11/2020

**Alexandre Augusto Moraes de Souza**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7416-3361>

Universidade Federal do Pará, Brasil

E-mail: [amsalexandre02@gmail.com](mailto:amsalexandre02@gmail.com)

**Davi do Socorro Barros Brasil**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1461-7306>

Universidade Federal do Pará, Brasil

E-mail: [davibb@ufpa.br](mailto:davibb@ufpa.br)

**Cintya Cordovil Rodrigues**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6111-4405>

Universidade Federal do Pará, Brasil

E-mail: [cintya.cordovil@hotmail.com](mailto:cintya.cordovil@hotmail.com)

**Sônia Maria de Freitas Almeida**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7043-0554>

Universidade Federal do Pará, Brasil

E-mail: [sonia.almeidafreitas@gmail.com](mailto:sonia.almeidafreitas@gmail.com)

**Nayara Maria Monteiro da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8291-8012>

Universidade Federal do Pará, Brasil

E-mail: [nayengquimica8@gmail.com](mailto:nayengquimica8@gmail.com)

**Maria Fani Dolabela**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0804-5804>

Universidade Federal do Pará, Brasil

E-mail: [fanidolabela@gmail.com](mailto:fanidolabela@gmail.com)

**Dayse Lúcia do Nascimento Brandão**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1311-0033>

Universidade Federal do Pará, Brasil

E-mail: [daysebrandao996@gmail.com](mailto:daysebrandao996@gmail.com)

**Luciane do Socorro Nunes dos Santos Brasil**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5121-009X>

Universidade do Estado do Pará, Brasil

E-mail: [luciane.brasil@uepa.br](mailto:luciane.brasil@uepa.br)

**Resumo**

O objetivo deste trabalho foi quantificar os compostos fenólicos e avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos da casca do caule do *Croton cajucara* BENTH. Um planejamento experimental (Box Hunter e Hunter) de dois fatores e dois níveis determinam quais variáveis que influenciam no processo de extração. Para a quantificação dos compostos fenólicos foi utilizada a metodologia de Folin-Ciocalteu. Para a atividade antioxidante foi aplicado o método IC<sub>50</sub>. Para a análise antimicrobiana, o método de microdiluição foi empregado para indicar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra as cepas bacterianas, bem como cepas fúngicas. Na quantificação dos compostos fenólicos, houve variação entre 26,98 e 50,32 mgEAG/g. Em relação à atividade antioxidante, foram encontrados valores de 9,01% a 14,03%. Quanto à atividade antimicrobiana, os extratos não inibiram o crescimento das bactérias e fungos testados. Todos os resultados foram tratados estatisticamente e, em geral, comprovaram que as melhores condições de extração foram T= 60 ° C e G= 0,10 mm.

**Palavras-chave:** *Croton cajucara* BENTH; Extração; Produto natural.

**Abstract**

The main objective of this work was to quantify the phenolic compounds, and to evaluate antioxidant and antimicrobial the activity of *Croton cajucara* BENTH stem bark extracts. An experimental planning (Box Hunter and Hunter) of two factors and two levels determine which variables influenced in the extraction process was used. To the quantification of phenolic compounds was used the methodology of Folin-Ciocalteu. To the antioxidant activity the IC<sub>50</sub> method was applied. For the antimicrobial analysis, the microdilution method was employed to indicate the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against the bacterial strains, as well as fungal strain. In the quantification of phenolic compounds, there was a

variation between 26.98 and 50.32 mgEAG /g. Regarding antioxidant activity, values from 9.01% to 14.03% were found. For antimicrobial activity, the extracts did not inhibit the growth of the tested bacteria and fungi. All the results were treated statistically and, in general, proved that the best extraction conditions were  $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $G = 0.10\text{ mm}$ .

**Keywords:** *Croton cajucara* BENTH; Extraction; Natural product.

## Resumen

El objetivo de este trabajo fue cuantificar los compuestos fenólicos y evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos de corteza del tallo de *Croton cajucara* BENTH. Un diseño experimental (Box Hunter y Hunter) de dos factores y dos niveles determina qué variables influyen en el proceso de extracción. Para la cuantificación de compuestos fenólicos se utilizó la metodología de Folin-Ciocalteu. Para la actividad antioxidante se aplicó el método IC50. Para el análisis antimicrobiano se utilizó el método de microdilución para indicar la Concentración Mínima Inhibidora (CMI) frente a cepas bacterianas, así como cepas fúngicas. En la cuantificación de compuestos fenólicos, hubo una variación entre 26,98 y 50,32 mgEAG/g. En cuanto a la actividad antioxidante, se encontraron valores de 9.01% a 14.03%. En cuanto a la actividad antimicrobiana, los extractos no inhibieron el crecimiento de las bacterias y hongos probados. Todos los resultados fueron tratados estadísticamente y, en general, demostraron que las mejores condiciones de extracción fueron  $T= 60\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $G= 0.10\text{ mm}$ .

**Palabras clave:** *Croton cajucara* BENTH; Extracción; Producto natural.

## 1. Introdução

O emprego de produtos naturais, sobretudo da flora, para fins quimioterápicos, surgiu com a humanidade. Os primeiros sinais do uso de plantas, com suposto caráter medicinal, foram encontrados nas civilizações mais antigas, sendo considerada uma das práticas mais remotas utilizada pelo ser humano para a prevenção, cura e tratamento de doenças, servindo como importante fonte de compostos biologicamente ativos (Andrade, Cardoso & Bastos, 2007). Toda essa informação foi, de início, sendo transmitida oralmente às gerações posteriores. Com o surgimento da escrita, passou a ser preservada como um tesouro (Araújo et al, 2007).

A utilização de plantas como medicamento está fundamentada, portanto, em estudos etnofarmacológicos que, partindo do uso tradicional e do conhecimento popular sobre as

propriedades farmacológicas de certos vegetais, indicam o potencial para o desenvolvimento de novos fitoterápicos. Neste contexto, as plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais podem-se utilizar para a síntese de inúmeros fármacos (Scopel, 2005).

Atualmente, o interesse popular nas plantas medicinais para fins terapêuticos tem sido muito significativo, devido ao difícil acesso da população aos medicamentos sintéticos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), entre 60-80% da população mundial utiliza a medicina tradicional ou a fitoterapia no tratamento de várias doenças (Bagatini, Silva & Tedesco, 2007).

A espécie *Croton cajucara* BENTH (CcB) pertencente à família *Euphobiaceae* é encontrada com frequência na Região Amazônica. Esta é conhecida como “Sacaca” que significa “feitiço” na língua Tupi, e apresenta um grande valor medicinal no tratamento de diversas doenças. A folha e a casca do caule desse vegetal são utilizadas de forma empírica pelo homem na forma de chá, para o tratamento de doenças como: diabetes, diarreia, malária, febre, distúrbios gastrintestinais, renais, hepáticos e no controle de elevados níveis de colesterol (Di stasi et al, 1989).

Os vegetais de caráter antioxidante são compostos nos quais apresentam a capacidade de inibir ou bloquear processos oxidativos, quando em baixas concentrações. O equilíbrio físico-químico de alguns produtos é obtido através da adição de antioxidantes sintéticos, como butil-hidroxi-tolueno (BHT) e butil-hidroxianisol (BHA), porém estas substâncias apresentam riscos à saúde humana. Portanto, a pesquisa por antioxidantes de fontes naturais que possam substituir os sintéticos tem recebido muita atenção por parte do segmento acadêmico e industrial (Decker, 2008; Matkowski, 2008; Reische, Lillard & Eitenmiller, 2008; Botterweck et al, 2000; Dahanukar et al, 2000).

Outro fator a ser considerado é a ação antimicrobiana, nos quais acarretam diversas patogenias nos seres humanos, mas no final da década de XX houve um aumento significativo na busca de agentes antimicrobianos naturais (Rauha, 2000).

Até o presente momento, nenhuma pesquisa avaliou a interferência de processos de extração para a obtenção de atividades antioxidante e antimicrobiana, bem como quantificação de polifenóis totais das cascas do caule da *Croton cajucara* BENTH.

## 2. Metodologia

Neste estudo foram coletados cascas do caule de *Croton cajucara* BENTH na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), cidade de Belém, no estado do Pará.

As cascas do caule do vegetal foram devidamente secas em estufas com ar circulante à temperatura de 30°C por 72h, para remoção prévia de umidade. Após isso, os materiais foram submetidos a processos de trituração utilizando o moinho de facas e, posteriormente, moinho de bolas, a fim de se obter as granulometrias ideais para a extração. Após isso, realizou-se a análise granulométrica obtendo material do tipo pó fino e moderadamente grosso nos quais foram destinados ao planejamento experimental utilizando extração do tipo sólido-líquido em um extrator de aço-inox. A casca do caule do *Croton cajucara* BENTH foi pesada obtendo uma massa total de um quilo e cem gramas (1,1 Kg), deste material foram pesadas oito amostras de cem gramas (100 g), cada uma, sendo quatro amostras do material dito pó fino e quatro do pó moderadamente grosso.

Após isso, é realizada uma análise granulométrica para a classificação da literatura, dos materiais com granulometrias diferentes. Em seguida é realizada uma extração convencional com o intuito de obter os extratos vegetais, para assim, obter as variáveis de resposta atividade antioxidante, compostos fenólicos e atividade microbiana.

### 2.1 Análise Granulométrica

Peneiras da série Tyler (W.S. Tyler, USA) foram selecionadas e pesadas para a realização do estudo em questão. Para a análise empregou-se uma massa total de 1.076,6g. Após isso, o equipamento foi ligado, depois de 15 min, sob agitação *Rot-Up*, as peneiras foram pesadas novamente para a determinação da quantidade de amostra retida em cada peneira. As massas obtidas foram acondicionadas em sacos plásticos.

### 2.2 Extração do material

Para o processo de extração convencional (material botânico e etanol), utilizou-se em escala laboratorial, um extrator encamisado, feito de aço inoxidável, com agitador mecânico, acoplado a um banho termostático de circulação de fluido. A parte superior do extrator dispõe de 3 orifícios, os quais são utilizados um para introdução do agitador mecânico, um para o termômetro e outro era fechado com um bico de vidro. Periodicamente, media-se a temperatura interna do reator (Brasil et al., 2019).

As variáveis empregadas foram temperatura e granulometria, sendo estas estabelecidas pelo planejamento Box Hunter e Hunter, modelo constituído em dois níveis (+1, -1) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Variáveis de entrada e seus níveis.

VARIÁVEL REAL (UND)	VARIÁVEL CODIFICADA	NÍVEIS	
		-1	1
Temperatura (°C)	X <sub>1</sub>	50	60
Granulometria (mm)	X <sub>2</sub>	0,10	0,51

Legenda: X<sub>1</sub>= temperatura; X<sub>2</sub>= granulometria; °C= Graus Celsius; mm= milímetros. Fonte: Arquivo pessoal.

Na Tabela 1 é o nível -1 corresponde a temperatura de 50 °C e granulometria de 0,10 milímetros. Já o nível 1 equivale a temperatura de 60 °C e granulometria de 0,51 milímetros.

Em relação aos fatores fixos temos: a agitação, massa do material botânico, relação massa solvente e tempo de extração.

Para as variáveis de entrada, a quantificação de compostos fenólicos, avaliação da atividade antioxidante e avaliação da atividade antimicrobiana foram avaliados como análise de resposta.

Os testes experimentais foram dispostos de forma aleatória, como é fornecido pela matriz de planejamento (Tabela 2).

**Tabela 2.** Matriz de experimentos com parâmetros variáveis.

ENSAIO	VARIÁVEIS CODIFICADAS	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1	-1
6	1	-1
7	-1	1
8	1	1

Fonte: Arquivo pessoal.

A Tabela 2 mostra como os ensaios foram realizados segundo as suas variáveis codificadas. Por exemplo: O ensaio 1 é submetido à temperatura de 50 °C e a granulometria do material botânico é de 0,10 milímetros.

### **2.3 Quantificação de compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos totais dos extratos do CcB foram quantificados através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Gutfinger, 1981) com algumas alterações, utilizando o ácido gálico para construção de uma curva-padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por g de peso seco da amostra (mg EAG/g).

Preparou-se uma solução mãe de cada um dos 8 ensaios com 10 mg do extrato bruto para 3 mL de álcool etílico (1:3), posteriormente tiveram seus pHs ajustados para neutro (pH=7), utilizando uma solução de carbonato de sódio (NaCO<sub>3</sub>). O valor de absorvância em que os ensaios devem ficar é entre 0,300 a 0,700.

Em cubetas de leitura, foram adicionados 0,075 mL de amostra, 1,675 mL de solução saturada de carbonato de sódio e 0,25 mL de Folin-Ciocalteu formando um meio reacional de coloração azulada. Este procedimento foi realizado para as amostras 1, 3, 4, 6 e 8, onde estas foram diluídas 6,67 vezes. Com relação à amostra 2, empregou-se 0,045 mL de amostra, 1,705 mL de solução saturada de carbonato de sódio e 0,250 mL de Folin-Ciocalteu, o qual caracteriza uma diluição de 11,111 vezes. Já para a amostra 5 foi necessário de 0,060 mL de amostra, 1,690 mL de solução saturada de carbonato de sódio e 0,25 mL de Folin-Ciocalteu. O que fornece uma diluição de 8,333 vezes. Para a amostra 7, necessitou-se uma diluição de 10 vezes. Neste caso, utilizou-se 0,050 mL de amostra, 1,700 mL de solução saturada de carbonato de sódio e 0,25 mL de Folin-Ciocalteu.

As cubetas foram isoladas, à temperatura ambiente e após 30 minutos foi realizada a leitura de absorvância em espectrofotômetro a 760 nm (UV-Vis).

### **2.4 Avaliação Antioxidante**

Para a determinação do potencial antioxidante dos ensaios, utilizou-se o cromóforo DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (Cavin et al, 1998; Bouchet, Barrier & Fauconneau, 1998). Para a realização do experimento, foi necessário preparar uma solução de DPPH 0,06

mM momentos antes de seu uso. Preparou-se uma solução mãe de cada um dos 8 ensaios com 20 mg de extrato bruto para 1 mL de etanol. Em cubetas de leitura, transferiu-se 0,05 mL da amostra 1,95 mL de solução de DPPH 0,06 mM (AA). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, marca QUIMIS, a 570 nm em tempos de 0 min, 15 min, 30 min, 45 min e 60 min.

Estabeleceu-se a absorbância do controle (AC) através da medição da absorbância da mistura de 1,95 mL de DPPH 0,06 mM (violeta) e 0,5 mL de metanol.

Para o branco cada uma das soluções dos extratos estudados (0,5 mL), foram inseridos 1,95 mL de álcool metílico (AB).

O teste foi realizado em triplicata. A atividade antioxidante foi determinada em termos porcentagem de reação segundo a equação 2.

A IC<sub>50</sub> determina que quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua IC<sub>50</sub> e maior a sua atividade antioxidante (Sousa et al, 2007).

$$\% \text{inibição} = \frac{[(AA - AB)]}{AC} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

AA: absorbância da amostra;

AB: absorbância do branco;

AC: absorbância do controle negativo.

## 2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para os testes da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Staphylococcus aureus*, ATCC 29213; *Salmonella spp.* ATCC 14029, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583, *Candida albicans* ATCC 1009 e *Proteus mirabilis* ATCC 7002, obtidas da FIOCRUZ/Laboratório Central do Estado do Pará (LACEN-PA).

Os extratos foram submetidos a testes de microdiluição, para a determinação da CIM (Eloff, 1998), onde utilizou-se as concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL por poço. As amostras foram diluídas em álcool metílico P.A.



Em 54 poços da placa com 96 poços adicionou-se 0,180 mL de caldo Müller Hinton, 0,010 mL das amostras (extratos da casca do *CcB*) e 0,010 mL das suspensões bacterianas, num total de 0,200 mL.

Para o controle negativo foi utilizado uma mistura contendo 0,010 mL da suspensão bacteriana + 0,010 mL de gentamicina (antibiótico para bactérias) ou nistatina (antibiótico para fungo) e 1,80 mL de caldo Müller Hinton; já para o controle positivo, em 3 poços empregou-se 0,180 mL de álcool metílico 99,5% e em outros 3 poços 0,180 mL de caldo Müller Hinton (Wayne, 2007).

Após isso, as placas foram cobertas com papel alumínio e postas em uma estufa bacteriológica à 35°C por 24 h. Posteriormente, foi adicionada à placa teste, 0,010 mL de uma solução de MTT (2 mg/mL), sendo que a placa foi novamente incubada por 3 horas. O MTT é um sal de tetrazólio, que possui coloração amarela, no entanto em células viáveis esse sal é reduzido a formazan que apresenta coloração azul.

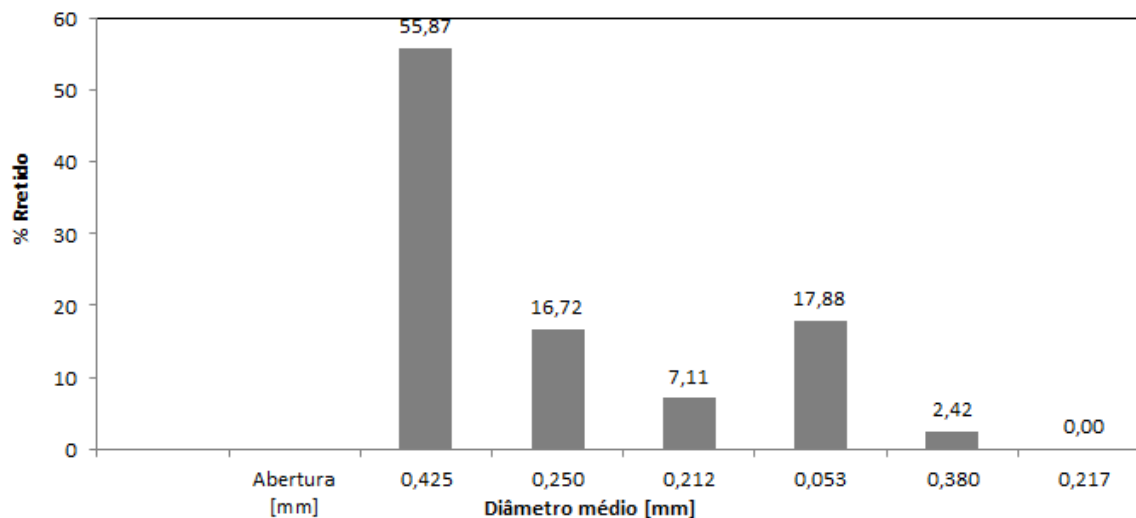
### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1 Análise Granulométrica da Casca do *Croton cajucara* BENTH**

Para a realização da análise granulométrica do material botânico, utilizou-se peneiras Tyllers de 30, 60, 65, 270 e 400  $\mu\text{m}$ , além de um coletor o qual determinou as faixas granulométricas. As faixas nos quais a casca do caule do material botânico foram mais retidas 0-35  $\mu\text{m}$  e 65-270  $\mu\text{m}$ , apresentando respectivamente 55,87% e 17,88% (Tabela 3 e Figura 1).

O material contido na peneira de diâmetro de 0,425  $\mu\text{m}$  é dito como pó moderadamente grosso, o qual é aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 710  $\mu\text{m}$  e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250  $\mu\text{m}$ . Já para o material retido nas peneiras com diâmetros de 0,212  $\mu\text{m}$  a 0,380  $\mu\text{m}$  é dito como pó fino, que é aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 180  $\mu\text{m}$  (Agência nacional de vigilância sanitária, 2010).

**Figura 1.** Gráfico da Distribuição Granulométrica da casca do caule do CcB.



Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 1 é possível observar que a peneira que apresentou maior material retido foi a com abertura de 0,425 milímetros e a menor foi a de 0,380 milímetros.

**Tabela 3.** Dados utilizados para os cálculos do Diâmetro médio de Sauter.

TYLER (mm)	MASSA RETIDA (g)	PERCENTUAL DE MASSA RETIDA (%)
35	601,50	55,87
60	180,00	16,72
65	76,60	7,11
270	192,50	17,88
400	26,00	2,42
-400	0,00	0,00
TOTAL	1076,60	100,00

Fonte: Arquivo pessoal.

Na Tabela 3 verifica-se que a quantidade de massa retida no Tyler de 35 milímetros reteve mais da metade de todo o material utilizado no trabalho.

Aplicando os valores obtidos com a análise distribuição granulométrica na **equação 2**, obteve-se um diâmetro médio de Sauter das partículas para o pó moderadamente grosso de 0,51 mm e 0,10 mm para o pó fino.

$$D_m = \sum Pr \quad (2)$$

Onde:

D<sub>m</sub> = Diâmetro médio de Sauter;

Pr = Produtório obtido.

### 3.2 Quantificação de Compostos Fenólicos

A Tabela 4 contém os valores da quantificação dos compostos fenólicos totais dos extratos. Os valores foram calculados a partir da equação de regressão  $y = 14,35x$ , com coeficiente de correlação ( $R^2$ ) igual a 0,975, o qual foi obtido pela curva de calibração do ácido gálico (y é a absorbância a 750 nm e x é a concentração em mg de ácido gálico em g de extrato).

**Tabela 4.** Resultados da variável de resposta Compostos Fenólicos.

ENSAIOS	VARIÁVEIS REAIS		CF
	T (°C)	G (mm)	mg EAG/g
1	50	0,10	32,33
2	60	0,10	48,47
3	50	0,51	36,30
4	<b>60</b>	<b>0,51</b>	<b>26,98</b>
5	50	0,10	37,60
6	<b>60</b>	<b>0,10</b>	<b>50,32</b>
7	50	0,51	41,47
8	60	0,51	31,71

Legenda: T= Temperatura; G= Granulometria; CF= Compostos fenólicos; EAG= Equivalente Ácido Gálico; mm= milímetro; mg= miligrama; g= grama; °C= Graus Celsius. Fonte: Arquivo pessoal.

Na Tabela 3 é possível observar a maior quantidade de compostos fenólicos foi encontrada no ensaio 4 e a maior no ensaio 6.

### 3.2.1 Análise estatística da variável de resposta Compostos Fenólicos (CF)

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ), para a análise da variância para a variável de resposta Compostos Fenólicos, foi de 0,9145 ou 91,45%, onde o modelo proposto, bem como para a resposta RD, descreveu adequadamente a resposta analisada.

Na tabela 5, é possível verificar os valores dos efeitos dos parâmetros, o qual nos fornece a informação de que as variáveis isolada  $X_2$  (G) e de combinação binária  $X_1 \times X_2$  (T x G), apresentaram influência significativa para a resposta CF.

**Tabela 5.** Efeitos estimados para Quantificação dos Compostos Fenólicos.

FATOR	EFEITOS $\pm$ ERRO PADRÃO
Média	38,15 $\pm$ 1,12
$X_1$	2,45 $\pm$ 2,24
$X_2$	<b>-8,07 <math>\pm</math> 2,24</b>
<b>(<math>X_1 \times X_2</math>)</b>	<b>-11,99 <math>\pm</math> 2,24</b>

Fonte: Arquivo pessoal.

A variável  $X_1$  causa um efeito positivo, já  $X_2$  e  $X_1 \times X_2$  causaram um efeito negativo na variável de resposta.

A análise da ANOVA (Tabela 6), para a variável de resposta CF confirmou que as variáveis  $X_2$  e  $X_1 \times X_2$  apresentaram influência estatisticamente significativa em um nível de significância menor que 5% ( $p < 0,05$ ), onde mostra uma menor probabilidade de estar na região de hipótese nula (sem significância estatística para a resposta).

**Tabela 6.** ANOVA para Quantificação dos Compostos Fenólicos.

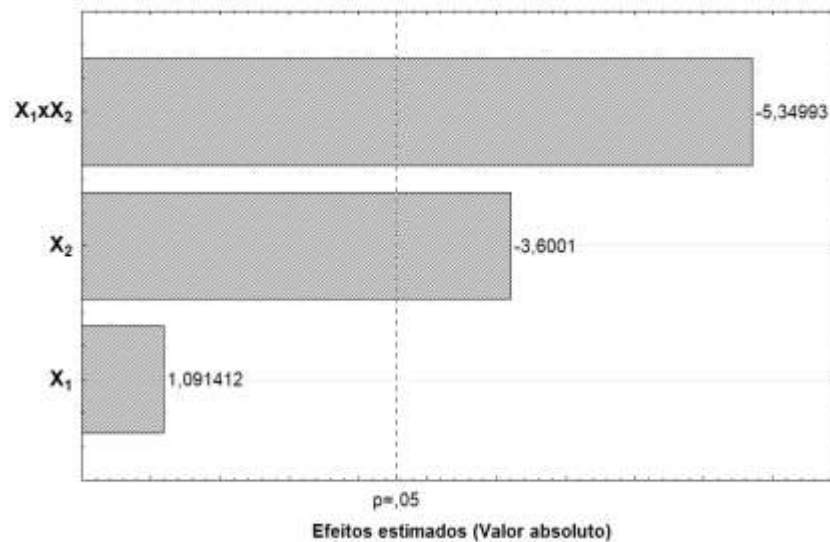
FATOR DE VARIAÇÃO	SQ	GL	MQ	p
$X_1$	11,96	1	11,96	0,336
$X_2$	<b>130,09</b>	<b>1</b>	<b>130,09</b>	<b>0,023</b>
<b>(<math>X_1 \times X_2</math>)</b>	<b>287,28</b>	<b>1</b>	<b>287,28</b>	<b>0,006</b>
Erro Puro	40,15	4	10,04	
Total SQ	469,47	7		

Legenda:  $R^2 = 0,9145$ . Fonte: Arquivo pessoal.

Neste caso, a variável  $X_1$  (T), não apresentou influência estatística na variável de resposta CF.

O gráfico de pareto (Figura 2) confirmou que as variáveis isoladas  $X_1 \times X_2$  (T x G) e  $X_2$  (G) apresentaram significância em 95% do limite de confiança, uma vez que as variáveis estão à direita da reta vertical indicativa do limite de rejeição da hipótese nula.

**Figura 2.** Gráfico de pareto para a resposta Compostos Fenólicos.



Fonte: Arquivo pessoal.

As variáveis  $X_1 \times X_2$  e  $X_2$  apresentaram um efeito que causava uma redução na quantificação dos compostos fenólicos totais do processo extrativo.

De acordo com as variáveis influentes para os valores de CF, que foi observado na análise estatística realizada anteriormente, propõe-se o modelo estatístico genérico de 1ª ordem está apresentado na equação 3.

$$PT = \beta_0 + \beta_1 X_2 + \beta_2 X_1 X_2 \quad (3)$$

Substituindo os valores dos coeficientes de regressão (Tabela 7), obtêm-se a equação 4.

**Tabela 7.** Coeficientes de regressão para a variável de resposta Compostos Fenólicos.

PARÂMETROS	COEICIENTES
Média	38,15
X <sub>2</sub>	-4,03
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-5,99

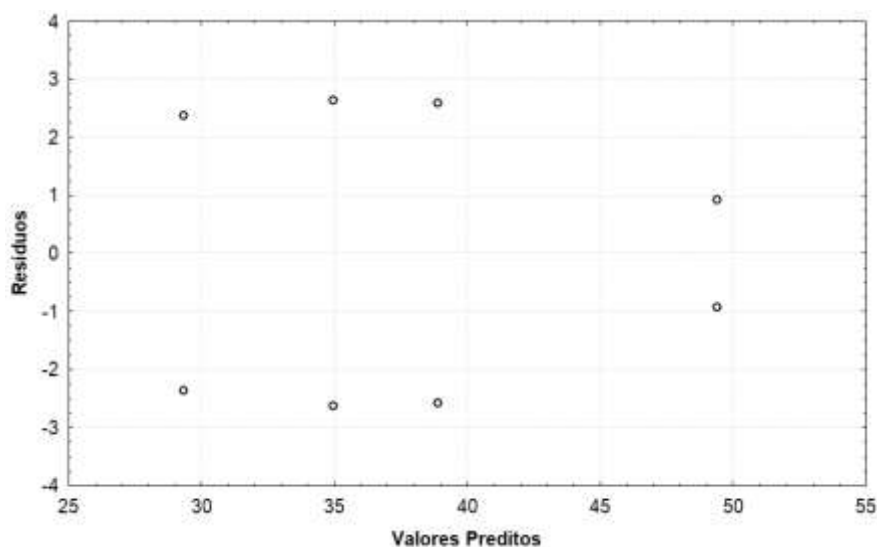
Fonte: Arquivo pessoal.

Os coeficientes de regressão significativos foram X<sub>2</sub> (efeito positivo) e X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> (efeito negativo).

$$PT = 38,15 - 4,03X_2 - 5,99X_1X_2 \quad (4)$$

A análise que mostra a distribuição dos resíduos de forma aleatória, não apresentando comportamento sistemático ou tendencioso (Figura 3).

**Figura 3.** Gráfico da Distribuição dos resíduos em função dos valores preditos para os Compostos Fenólicos

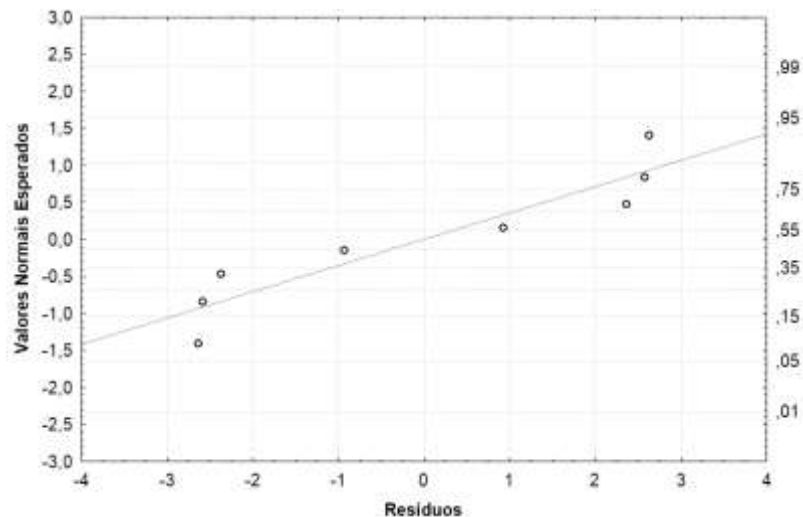


Fonte: Arquivo pessoal.

Para a resposta Compostos Fenólicos, os resíduos apresentaram de forma aleatória.

A Figura 4 apresenta a distribuição de probabilidade normal dos resíduos, onde os pontos terão de estar devidamente muito próximos ou centralizados na reta que intercepta o gráfico. Neste caso, alguns pontos se dispersaram da reta.

**Figura 4.** Gráfico do Teste de Normalidade para Compostos Fenólicos.

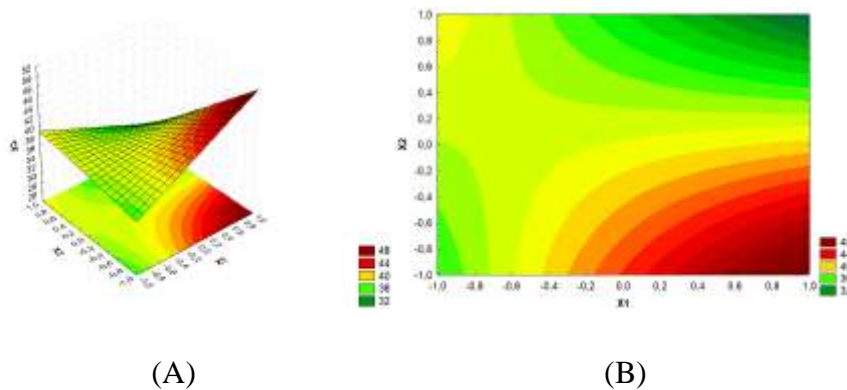


Fonte: Arquivo pessoal.

Verifica-se que modelo proposto gerou resíduos altos que vão de -4 a 4 e que não há tanta precisão nos valores de compostos fenólicos fornecido pelo modelo de regressão. No gráfico de normalidade é verificado que os pontos experimentais estão dentro da curva.

O gráfico de superfície de resposta mostra que no eixo z a resposta é em CF e nos eixos x e y, as variáveis  $X_1$  e  $X_2$  (Figuras 5 (A) e (B)).

**Figura 5.** (A) Gráfico da Superfície de Resposta para os Compostos Fenólicos e (B) Curva de Nível para Compostos Fenólicos



Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 5 (A) e (B) é possível observar que as condições que propiciam o aumento da quantificação dos compostos fenólicos, elas são  $X_1$  (temperatura) no seu nível máximo +1 e  $X_2$  (granulometria) no seu valor mínimo -1, em outras palavras,  $T = 60^\circ\text{C}$  e  $G = 0,10\text{ mm}$ .

### 3.3 Avaliação da atividade antioxidante (AA)

Na Tabela 8 consta a atividade antioxidante determinada pelo ensaio de DPPH. Os resultados foram expressos em IC<sub>50</sub> e variaram de 9,01% (ensaio 6) à 14,03% (ensaio 7). Devido ao ensaio 1 apresentar as mesmas condições de extração do ensaio 5, bem como o 2, semelhante ao 6, 3, correlato ao 7 e 4, equivalente a 8, então esperava-se que os valores de atividade antioxidante fossem similares, o que de fato ocorreu (Brasil et al., 2019).

**Tabela 8.** Resultados da variável de resposta Atividade Antioxidante

ENSAIOS	VARIÁVEIS REAIS		AA
	T (°C)	G (mm)	(IC <sub>50</sub> )
1	50	0,10	10,80
2	60	0,10	13,63
3	50	0,51	11,10
4	<b>60</b>	<b>0,51</b>	<b>14,03</b>
5	50	0,10	9,45
6	<b>60</b>	<b>0,10</b>	<b>9,01</b>
7	50	0,51	8,94
8	60	0,51	13,11

Legenda: T= Temperatura (°C); G= Granulometria (mm); AA= Atividade Antioxidante; IC<sub>50</sub>= Concentração mínima responsável por diminuir o DPPH em 50 %; mm= milímetro; °C= Graus Celsius. Fonte: Arquivo pessoal.

O ensaio com maior valor antioxidante foi o 4, onde foi empregada uma temperatura de 60 °C e granulometria de 0,51 milímetros.

#### 3.3.1 Análise estatística da variável antioxidante

A análise de variância (Tabela 9) mostrou que para as variáveis isoladas lineares X<sub>1</sub> (T) e X<sub>2</sub> (G) e a variável combinada X<sub>1</sub>xX<sub>2</sub> (T x G) não apresentaram significância um nível de significância menor ou igual a 5% do limite de confiança (p<0,05), onde mostra uma menor probabilidade de estar na região de hipótese nula (sem significância estatística para a resposta).



**Tabela 9.** ANOVA para Atividade Antioxidante.

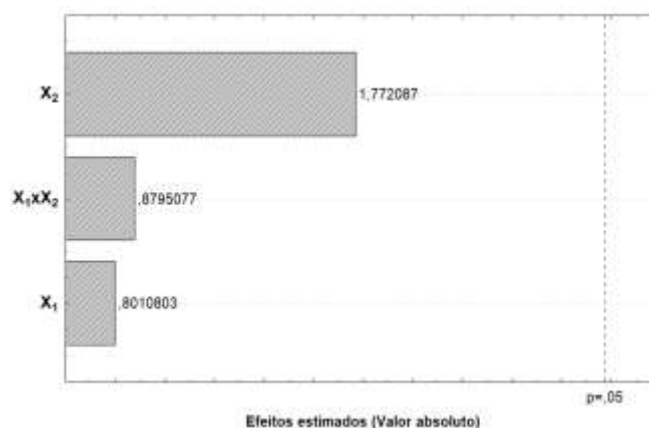
FATOR DE VARIAÇÃO	SQ	GL	MQ	p
X <sub>1</sub>	11,26	1	11,26	0,15
X <sub>2</sub>	2,30	1	2,30	0,7
(X <sub>1</sub> x X <sub>2</sub> )	2,77	1	2,77	0,43
Erro Puro	14,34	4	3,58	
Total SQ	30,67	7		

Fonte: Arquivo pessoal.

Nenhuma das variáveis de entrada foram influentes para a variável de resposta (AA).

O gráfico de pareto (Figura 6), confirmou que as variáveis isoladas X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub> e combinadas X<sub>1</sub>xX<sub>2</sub> não apresentaram significância em 95% do limite de confiança.

**Figura 6.** Gráfico de Pareto para a resposta Atividade Antioxidante.



Fonte: Arquivo pessoal.

Uma vez que as variáveis estão à esquerda da reta vertical indicativa do limite de rejeição da hipótese nula, confirma-se que nenhuma variável de entrada foi influente para a variável de resposta análise antioxidante.

### 3.4 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Os extratos obtidos pela extração convencional da casca do CcB foram submetidos ao teste do CIM, o qual é a menor quantidade de amostra necessária para a inibição do

microrganismo. Porém, os extratos não inibiram os crescimentos das bactérias e fungo testados, apresentando uma CIM > 1000 µg/mL, não havendo atividade inibitória do ponto de vista clínico nesta concentração.

### 3.5 Função Desejabilidade

Para a otimização do processo extrativo diante das variáveis  $X_1$  e  $X_2$ , os quais são respectivamente, temperatura empregada e granulometria do material botânico, foi aplicada a técnica de otimização simultânea “Função Desejabilidade” (Derringer & Suich, 1980; Akhanazarova & Kafarov, 1982).

Na Tabela 10 observa-se os valores atribuídos para a otimização do processo extrativo (Statistica® 7.0). Para isso foram empregados os valores numéricos para o limite inferior (LI), valor mediano (M) e limite superior (LS), bem como, os valores dos expoentes  $s$  e  $t$ .

**Tabela 9.** Parâmetros utilizados na otimização da resposta Compostos Fenólicos.

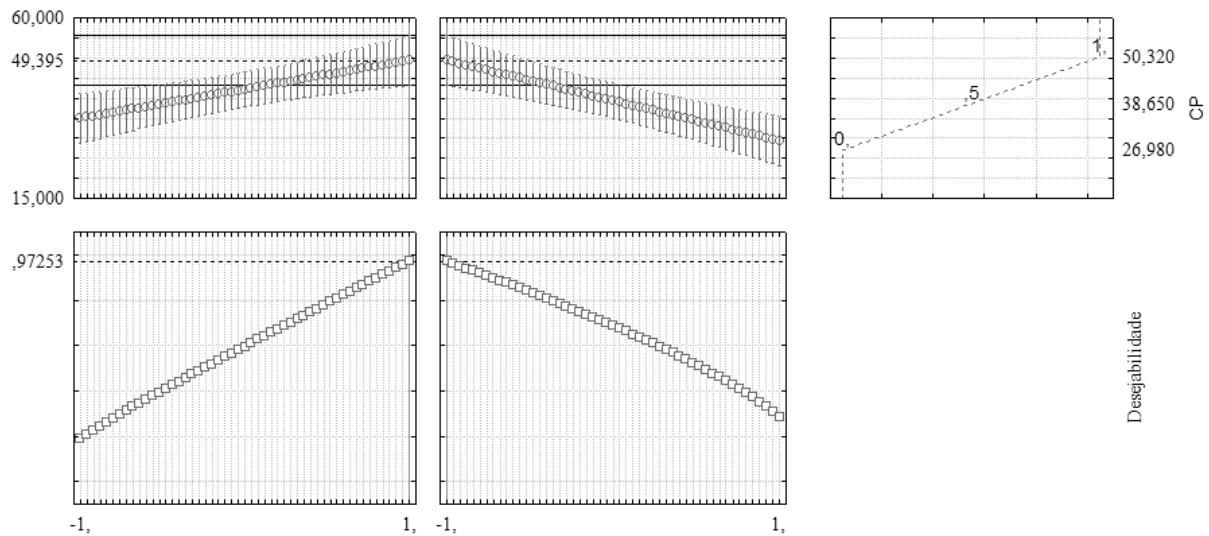
RESPOSTAS	LI	M	LS	s	t
CF	26,98 (0)	38,65 (0,5)	50,32 (1)	10	10

Legenda: CF= Compostos Fenólicos; L= Limite Inferior; M= Mediana; LS= Limite Superior. Fonte: Arquivo pessoal.

Os valores da Tabela 10 indicam a importância da função para encontrar o valor médio desejado. O valor 0 significa que o valor é indesejado, 0,5 moderadamente desejado e 1 muito desejado.

O diagrama da Função Desejabilidade, mostrado na Figura 7 usando os coeficientes  $s$  e  $t = 10$  e fator de grade igual a 50, apresentou um coeficiente de desejabilidade global (D) 0,9725 ou 97,25%, o qual é considerável uma resposta aceitável e excelente. Ademais, considerado o valor de desejabilidade 1, acima de 50%, para a variável de resposta Compostos Fenólicos.

**Figura 7.** Valores preditos para as variáveis de resposta Compostos Fenólicos e função desejabilidade.



Fonte: Arquivo pessoal.

Os níveis das variáveis  $X_1$  (T) e  $X_2$  (G) que otimizam as respostas são 1 e -1 respectivamente, ou seja,  $T = 60^\circ\text{C}$  e  $G = 0,10$  mm.

O valor ótimo para a variável de resposta é mostrado através das linhas tracejadas horizontais em azul, onde mostram que o valor ótimo para a variável de resposta Compostos Fenólicos 49,39%.

#### 4. Considerações Finais

Portanto, o método de extração empregado neste estudo foi eficiente para a obtenção da variável de resposta Compostos Fenólicos, porém não foi influente na resposta Atividade Antioxidante. Além disso, foi observado que a casca do caule do *Croton cajucara* BENTH não apresentou atividade frente as cepas bacterianas e fúngica estudadas.

Em relação à resposta Compostos Fenólicos, foi possível observar que as variáveis codificadas individuais  $X_2$  (Granulometria) e combinada  $X_1 \times X_2$  (Temperatura x Granulometria), foram significativos. Vale ressaltar que esses valores foram comprovados através análise de efeitos estimados, coeficientes de regressão, análise de variância, gráfico de pareto e modelo matemático proposto. Entretanto, para a atividade antioxidante as variáveis de entrada não apresentaram significância estatística.

De modo geral, os níveis para as variáveis codificadas  $X_1$  e  $X_2$  ideais para obtenção dos maiores valores das variáveis de resposta significativas foram +1 e -1, ou seja, temperatura de extração de 60°C e granulometria do material botânico de 0,10 mm.

Sugestão para trabalhos futuros: adicionar a temperatura de secagem como variável de entrada e comparar os resultados das variáveis de resposta entre os métodos de extração convencional e supercrítica.

## Referências

Agência nacional de vigilância sanitária. (2010). *Farmacopéia brasileira*. Brasília: Autor.

Akhanazarova, S., & Kafarov, V. (1982). *Experiment Optimization on Chemistry and Chemical Engineering*. Mir Publishers.

Andrade, S. F., Cardoso, L. G., & Bastos, J. K. (2007). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populonic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(3), 464-471. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.023>

Araújo, E. C., et al. (2007). Use of medicinal plants by patients with cancer of public hospitals in João Pessoa (PB). *Revista Espaço para a Saúde*, 8(2), 44-52. Recuperado de: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-464830>

Bagatini, M. D., Silva, A. C. F. & Tedesco, S. B. (2007). Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn*, 17(3), 444-447. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000300019>

Botterweck, A. A. M., et al. (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. *Food and Chemical Toxicology*, 38(7), 599-605. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00042-9)

Bouchet, N, Barrier, L., & Fauconneau, B. (1998). Radical scavenging activity and antioxidant properties of tannins from *Guiera senegalensis* (Combretaceae). *Phytotherapy*

*research*, 12(3), 159-162. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199805\)12:3<159::AID-PTR209>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199805)12:3<159::AID-PTR209>3.0.CO;2-C)

Brasil, D. S. B. B., Souza, A. A. M., Rodrigues, C. C., Costa, C. M. L. C., Santana, L. B. & Santana, E. B. (2019). *Revista de propriedade intelectual* (2504 ed.), Brasília: Instituto nacional de propriedade industrial.

Cavin, A., et al. (1998). Use of on-flow LC/1 H NMR for the study of an antioxidant fraction from *Orophea e nneandra* and isolation of a polyacetylene, lignans, and a tocopherol derivative. *Journal of natural products*, 61(12), 1497-1501. DOI: <https://doi.org/10.1021/np980203p>

Dahanukar, S. A., et al. (2000). Pharmacology of medicinal plants and natural products. *Indian journal of pharmacology*, 32(4), 81-118. Recuperado de: [https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as\\_sdt=0%2C5&q=Pharmacology+of+medicinal+plants+and+natural+products&btnG=](https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=Pharmacology+of+medicinal+plants+and+natural+products&btnG=)

Decker, E. A. (2008). *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology* (4a ed). CRC Press.

Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several variables. *Journal of Quality Technology*, 12(4), 214-219. DOI: <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>

Di stali, L. C., et al. (1988). Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of Sao Paulo. *Journal of ethnopharmacology*, 24(2-3), 205-211. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(88\)90153-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(88)90153-5)

Eloff, J. N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimalinhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Médica*, 64, 711-713. Recuperado de: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-957563>

Gutfinger, T. (1981). Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(11), 966-968. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02659771>

Matkowski, A. (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants – A review. *Biotechnology Advances*, 26(2), 548-560. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.001>

Rauha, J. P. (2000). Antimicrobial effects of finish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56(1), 3-12. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00218-X)

Reische, D. W., Lillard, D. A., & Eitenmiller, R. R. (2008). *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. CRC Press.

Scopel, M. (2005). *Análise Botânica, Química e Biológica Comparativa entre Flores das Espécies Sambucus nigra L. e Sambucus australis Cham. & Schltdl. e Avaliação Preliminar da Estabilidade*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. Recuperado de: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/6559>

Sousa, C. M. M, et al. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química nova*, 30(2), 351-355. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>

Wayne, P. A. (2007). Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, 1(1), 100-121. Recuperado de: <https://scholar.google.com/scholar?q=CLSI.+Performance+standards+for+antimicrobial+susceptibility+testing.+17+th++Informational+Supplement.+M100-S17+2007+Wayne,+PA+Clinical+and+Laboratory+Standards+Institute+>

**Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Alexandre Augusto Moraes de Souza – 30%

Davi do Socorro Barros Brasil – 20%

Cintya Cordovil Rodrigues – 20%

Sônia Maria de Freitas Almeida – 10%

Nayara Maria Monteiro da Silva – 5%

Maria Fani Dolabela – 15%

Dayse Lúcia do Nascimento Brandão – 15%

Luciane do Socorro Nunes dos Santos Brasil – 5%