UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

CAMILA DIEDRICH

OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM FOLHAS, CASCA E RESÍDUOS DE SEIVA DE *Croton lechleri*

DISSERTAÇÃO

Pato Branco
2018

CAMILA DIEDRICH

OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM FOLHAS, CASCA E RESÍDUOS DE SEIVA DE *Croton lechleri*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos” - Área do conhecimento: Química de Alimentos.

Professora Orientadora: Dra. Solange Teresinha Carpes.
Professor Coorientador: Dr. Gustavo Roberto Thomé

Pato Branco
2018

D559o Diedrich, Camila.
Otimização multivariada da extração de compostos bioativos em folhas, cascas e resíduos de seiva de *Croton lechleri* / Camila Diedrich. -- 2018.
135 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Solange Teresinha Carpes
Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Roberto Thomé
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2018.
Bibliografia: f. 126 - 133.

1. Superfícies (Tecnologia). 2. Compostos bioativos – Extração (Química). 3. Plantas medicinais. I. Carpes, Solange Teresinha, orient. II. Thomé, Gustavo Roberto, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco

Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Pato Branco
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

TERMO DE APROVAÇÃO Nº 64

Título da Dissertação

OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM FOLHAS, CASCA E RESÍDUOS DE SEIVA DE *Croton lechleri*

Autora

Camila Diedrich

Esta dissertação foi apresentada às 14h do dia 28 de fevereiro de 2018, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em alimentos – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Solange Teresinha Carpes
UTFPR/PB
Orientadora

Profa. Dra.Tatiane Luiza Cadorin Oldoni
UTFPR/PB
Examinadora

Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima
UTFPR/PB
Examinador

Profa. Dra. Maria Lurdes Felsner
UEL
Examinador

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP

Visto da Coordenação

Prof. Dra. Cristiane Regina Budziak Parabocz
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – PPGTP

AGRADECIMENTOS

Ao meu companheiro Cleber Silvano Schauss por todo apoio, dedicação e incontáveis xícaras de café e Coca-Cola.

Aos meus pais Marcos e Marli e meus irmãos, Marcos Junior e Ana Carolina, que sempre estiveram presentes e prontos a me auxiliar.

À Prof.ª. Dr.ª Solange Teresinha Carpes, pela orientação e dedicação.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima, pela ajuda nas análises estatísticas, dedicação e palavras de incentivo.

Ao grupo de pesquisa coordenado pela Prof.ª Solange, em especial aos colegas Amália, Leticia, Rafael, Giulia e Henrique, pela ajuda nas análises de laboratório.

À central de análises e a Prof.ª Dr.ª Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, por viabilizar a realização das análises cromatográficas.

Aos professores do Departamento de Química pelos ensinamentos e palavras de apoio nesses 13 anos de convivência.

Aos amigos do mestrado e da vida acadêmica, Aline Poyer, Aline Chitto Lopes, Ana Paula Buratto, Leticia Schaeffer, Maria Fernanda Ribas, Sheila C. Oliveira, Tiago Fávero e demais colegas de turma, que tornaram os dias mais tranquilos.

Ao anjo Denise Friedrich Braga, pelas sessões de acupuntura e pela minha “assistência técnica”.

À CAPES pelo incentivo financeiro e bolsa e pesquisa.

Aos amigos que a vida trouxe e que fizeram minha caminhada mais alegre e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa, agradeço.

RESUMO

DIEDRICH, Camila. **Otimização Multivariada de Extração de Compostos Bioativos em Folhas, Casca e Resíduos de Seiva de *Croton Lechleri.*** 2018. 135 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR, 2018.

As plantas naturais da Amazônia vêm instigando o interesse de pesquisadores a extrair os produtos desta região. O intuito destas pesquisas foca no desenvolvimento de novos fármacos a partir dos compostos bioativos de plantas visando o combate de inúmeras doenças associadas ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. A seiva, folhas e cascas de plantas do gênero *Croton* são utilizadas pelos povos nativos amazônicos para fins medicinais com ação cicatrizante, anti-inflamatória e antibacteriana. Este estudo teve como objetivo otimizar o processo de extração de produtos naturais de folhas, cascas de extratos de *C. lechleri*. O delineamento para extração de compostos naturais foi realizado por meio de planejamento fatorial 2^3 e análise por metodologia de superfície de resposta (RSM). Três fatores (variáveis independentes); tipo de solvente (água ou etanol), tempo de extração (30 ou 90 min) e temperatura de extração (35°C e 70°C) foram utilizados para o delineamento experimental. Enquanto que as variáveis dependentes; teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante por DPPH, e teor de antocianinas foram avaliadas nos extratos de *C. lechleri*. A composição da diversidade de compostos fenólicos foi investigada por cromatografia líquida de alta eficiência. O conjunto de dados foi submetido à análise de componentes principais (ACP). A melhor condição de extração de compostos fenólicos foi água, a 70 ºC por 30 min, enquanto que para os compostos com atividade antioxidante foi etanol, a 70 ºC por 90 min. A análise por cromatografia revelou a presença majoritariamente de ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido siríngico, ácido cumárico e ácido ferrúlico. Por fim, o delineamento fatorial permitiu a redução do número de ensaios realizados sem diminuir a qualidade da informação e dos resultados da análise de variância. Metodologia de superfície de resposta e análise de componentes principais empregadas provaram ser ferramentas eficientes para analisar dados da bioatividade de extratos de *C. lechleri*.

Palavras-chave: CLAE, metodologia de superfície de resposta, análise de componentes principais.

ABSTRACT

DIEDRICH, Camila. **Multivariate Optimization of Bioactive Compounds Extraction in *Croton Lechleri* Leaves, Bark and Sap Residue.** 2018. 135 f. Master's Dissertation (Master's degree in Technology Chemical and Biochemical Process) - Federal University of Technology of Paraná, Pato Branco, PR, 2018.

The natural plants of the Amazon have been instigating the interest of researchers to extract the products of the region. The purpose of this research focuses on no development of new drugs from bioactive plant compounds aimed at fighting numerous diseases associated with increased production of reactive oxygen species. The sap, leaves and barks of plants of the genus *Croton* are used by native Amazonian peoples for medicinal purposes with healing, anti-inflammatory and antibacterial action. This study aimed to optimize the extraction process of natural products from leaves, bark of *C. lechleri* extracts. The design for the extraction of natural compounds was performed by 2^3 factorial experimental design and analysis using Response Surface Methodology (RSM). Three factors (independent variables); type of solvent (water or ethanol), extraction time (30 or 90 min) and extraction temperature (35 °C and 70 °C) were used for the experimental design. While the dependent variables; content of phenolic compounds, antioxidant activity by DPPH, and anthocyanin content were evaluated in extracts of *C. lechleri*. The composition of the diversity of phenolic compounds was investigated by high performance liquid chromatography. The data set was submitted to Principal Component Analysis (PCA). The best extraction condition of phenolic compounds was water, at 70 ºC for 30 min, while for the compounds with antioxidant activity was ethanol, at 70 ºC for 90 min. Chromatographic analysis revealed the presence of gallic acid, catechin, epicatechin, syringic acid, coumaric acid and ferulic acid. Finally, the factorial design allowed the reduction of the number of tests carried out without diminishing the quality of information and the results of analysis of variance. Response Surface Methodology and Principal Component Analysis proved to be efficient tools used to analyze data bioactivity of extracts from *C. lechleri.*

Key words: HPLC, response surface methodology, principal component analysis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento fatorial 2^3 para a extração dos compostos com bioatividade em folhas, cascas e resíduo da seiva de *C. lechleri.* 31
Tabela 2 - Variáveis dependentes e independentes do delineamento fatorial 2^3 para extração dos compostos bioativos das folhas, cascas e resíduo da seiva de *C. lechleri.* 31
Tabela 3 - Gradiente de eluição das fases A (água acidificada com ácido acético 2%) e B (água: acetonitrila: ácido acético (58:40:2)) no isolamento e quantificação dos compostos fenólicos extraídos das folhas, cascas e resíduo da seiva de *C. lechleri*. 33
Tabela 4 - Resultados obtidos referente ao delineamento fatorial para CFT (mg EAG g^{-1}) e AA (µmol Trolox g^{-1}) em extratos da casca de *C. lechleri.* 39
Tabela 5 - Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis dependentes CFT e AA em extratos da casca de *C. lechleri.* 40
Tabela 6 - Resultados obtidos referente ao delineamento fatorial para CFT (mg EAG.g^{-1}) e AA (µmol de Trolox. g^{-1}) em extratos da folha de *C. lechleri.* 64
Tabela 7 - Resultados de ANOVA para as variáveis CFT e AA das folhas de *C. lechleri* 65
Tabela 8 - Modelos gerados por regressão linear múltipla para as variáveis dependentes, compostos fenólicos, atividade antioxidante em função dos fatores; tipo de solvente, tempo e temperatura. 67
Tabela 9 - Perfil dos compostos fenólicos quantificados por CLAE nos extratos de folha de *C. lechleri.* 72
Tabela 10 - Resultados obtidos referente ao delineamento fatorial para CFT (mg EAG.g^{-1}) e AA (µmol de Trolox. g^{-1}) em extratos da folha de *C. lechleri.* 94
Tabela 11 - Valores de ANOVA para os resultados CFT, AA e AT obtidos com o resíduo de seiva de *C. lechleri.* 95
Tabela 12 - Modelos gerados por regressão linear múltipla para as variáveis dependentes, compostos fenólicos, atividade antioxidante em função dos fatores; tipo de solvente, tempo e temperatura. 98
Tabela 13 - Perfil dos compostos fenólicos quantificados por CLAE nos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri.* 105

Tabela 14 - Valores de EC_{50}, FRAP, ABTS e DPPH para as amostras de casca, folha e resíduo de *C. lechleri.* 119
Tabela 15 - Valores de CIM* e CBM para os microrganismos testados com os extratos obtidos com as amostras de casa, folha e resíduo de *C. lechleri.* 123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore de *Croton lechleri* 20
Figura 2 - Corte do caule de *C. lechleri* para obtenção da seiva de coloração avermelhada.....20
Figura 3 - Estrutura química dos flavonoides. 23
Figura 4 - Reação entre o reagente Folin-Ciocalteu e o ácido gálico.....25
Figura 5 - Estrutura radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH.....26
Figura 6 - Reação entre o radical ABTS e o antioxidante sintético Trolox. 27
Figura 7- Redução do Fe^{3+} na presença de TPTZ. 28
Figura 8 - Fluxograma de atividades. 29
Figura 9 - Amostras de folhas, cascas e resíduo da seiva de *C. lechleri.* 30
Figura 10 - Gráficos de Pareto para CFT (esquerda) e AA (direita) dos extratos de casca de *C. lechleri.* 41
Figura 11 - Gráficos de superfície para compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos obtidos da casca de *C. lechleri.*.....43
Figura 12 - Gráficos de superfície para atividade antioxidante (AA) dos extratos obtidos da casca de *C. lechleri.*.....45
Figura 13 - Gráficos de Pareto para teor de ácido gálico dos extratos obtidos da casca de *C. lechleri* 47
Figura 14 - Gráficos de superfície para teor de ácido gálico dos extratos obtidos da casca de *C. lechleri.* 49
Figura 15 - Estrutura do ácido gálico.....50
Figura 16 - Gráficos de Pareto mostrando os fatores significativos ($p<0,05$) para catequina por meio de CLAE em extratos de casca de *C. lechleri.*.....51
Figura 17 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de catequina (ppm) obtido por CLAE a partir dos extratos de casca de *C. lechleri.* 53
Figura 18 - Estrutura da catequina. 54
Figura 19 - Gráficos de Pareto mostrando os fatores significativos ($p<0,05$) para extração de epicatequina da casca de *C. lechleri* por meio de CLAE. 55
Figura 20 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de epicatequina obtido por CLAE a partir dos extratos de casca de *C. lechleri.* 57

Figura 21 - Estrutura da epicatequina. 58
Figura 22 - Gráficos de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração de ácido siríngico da casca de *C. lechleri* por meio de CLAE. 59
Figura 23 - Estrutura do ácido siríngico.....60
Figura 24 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de ácido siríngico obtido por CLAE a partir dos extratos de casca de *C. lechleri.* 61
Figura 25 - Análise de componentes principais (PCA) para os dados obtidos através na análise cromatográfica dos extratos de casca de *C. lechleri.*.....62
Figura 26 - Gráficos de Pareto para CFT (esquerda) e AA (direita) dos extratos de folha de *C. lechleri.*.....66
Figura 27 - Gráficos de superfície para compostos fenólicos totais dos extratos obtidos da folha de *C. lechleri.* 68
Figura 28 - Gráficos de superfície para atividade antioxidante dos extratos obtidos das folhas *de C. lechleri*. 70
Figura 29 - Gráficos de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para o ácido gálico por meio de CLAE em extratos da folha de *C. lechleri.* 73
Figura 30 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de ácido gálico obtido por CLAE a partir dos extratos de folhas de *C. lechleri.* 75
Figura 31 - Gráficos de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para catequina por meio de CLAE em extratos de folha de *C. lechleri.* 76
Figura 32 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de catequina obtido por CLAE a partir dos extratos de folha de *C. lechleri.*.....78
Figura 33 - Gráficos de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração de epicatequina por meio de CLAE a partir do extrato de folha de *C. lechleri.*.....79
Figura 34 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de epicatequina obtido por CLAE a partir dos extratos de folhas de *C. lechleri.* 81
Figura 35 - Gráficos de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração de ácido siríngico dos extratos da folha de *C. lechleri* por meio de CLAE..82
Figura 36 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de ácido siríngico obtido por CLAE a partir dos extratos da folha de *C. lechleri.*.....84
Figura 37 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração de ácido cumárico por meio de CLAE. 85
Figura 38 - Estrutura do ácido cumárico. 86

Figura 39 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de ácido cumárico obtido por CLAE a partir dos extratos de folha de *C. lechleri.* 87
Figura 40 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração de ácido ferrúlico por meio de CLAE 88
Figura 41 - Estrutura do ácido ferrúlico. 89
Figura 42 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de ácido ferrúlico obtido por CLAE a partir dos extratos de *C. lechleri.* 90
Figura 43 - Análise de componentes principais (PCA) para os dados obtidos através na análise cromatográfica dos extratos de folha de *C. lechleri.* 91
Figura 44 - Gráficos de Pareto CFT (A), Antocianinas totais (B) e AA (C) dos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri.* 97
Figura 45 - Gráficos de superfície para compostos fenólicos totais dos extratos obtidos do resíduo de seiva de *C. lechleri.* 99
Figura 46 - Gráficos de superfície para atividade antioxidante dos extratos obtidos do resíduo de seiva de *C. lechleri.* 101
Figura 47 - Gráficos de superfície para antocianinas totais dos extratos obtido do resíduo de seiva de *C. lechleri.* 103
Figura 48 - Gráficos de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para o ácido gálico por meio de CLAE em extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri.* 106
Figura 49 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de ácido gálico obtido por CLAE a partir dos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri.* 108
Figura 50 - Gráficos de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para catequina por meio de CLAE em extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri.* 109
Figura 51 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de ácido gálico obtido por CLAE a partir dos extratos do resíduo de *C. lechleri.* 111
Figura 52 - Gráficos de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração de epicatequina por meio de CLAE a partir do extrato do resíduo de seiva de *C. lechleri.* 112
Figura 53 - Gráficos de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração de ácido siríngico dos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri* por meio de CLAE. 113
Figura 54 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de ácido siríngico obtido por CLAE a partir dos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri.* 115

Figura 55 - Análise de componentes principais (PCA) para os dados obtidos através na análise cromatográfica dos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri*. 116
Figura 56 - Curva cinética utilizada para a determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH EC_{50}. 119
Figura 57 - Placa de 96 revelada com clorafenicol mostrando o esquema de como foram dispostos extratos e controles. 121
Figura 58 - Cromatograma do mix de padrões de compostos fenólicos usados para comparação.....134
Figura 59 - Cromatogramas dos extratos da casca, folha e resíduo de *C. lechleri.* 135

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 OBJETIVOS 17
2.1 OBJETIVO GERAL 17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17
3 REFERENCIAL TEÓRICO 18
3.1 PLANTAS MEDICINAIS 18
3.3 COMPOSTOS BIOATIVOS EM PLANTAS: PRESENÇA MAJORITÁRIA DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES 21
3.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS 23
3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS 25
3.6 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 25
3.6.1 Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) 26
3.6.2 Sequestro do radical 2,2-azino-bis (3-benzotiazolina-6ácido sulfônico) (ABTS) 27
3.6.3 Poder antioxidante redutor do ferro (FRAP) 27
4 MATERIAIS E MÉTODOS 29
4.1 AMOSTRAS 29
4.2 EXTRAÇÃO E DELINEAMENTO FATORIAL 2^3 30
4.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) 32
4.4 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS 33
4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 33
4.5.1 Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) 33
4.5.2 Sequestro do radical 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) 34
4.5.3 Poder antioxidante redutor do ferro (FRAP) 35
4.6 TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS 35
4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 36
4.7.2 Concentração bactericida mínima (CBM) 37
5 RESULTADOS 39

5.1 RESULTADOS OBTIDOS COM O USO DE EXTRATOS DE CASCA DE *C. LECHLERI* 39
5.1.1 Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante nas cascas de *C. lechleri* 39
5.1.2 Determinação de compostos fenólicos da casca de *C. lechleri* por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 46
5.2 RESULTADOS OBTIDOS COM O USO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *C. LECHLERI* 63
5.2.1 Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante nas folhas de *C. lechleri* 63
5.2.2 Determinação de compostos fenólicos da folha de *C. lechleri* por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 71
5.3 RESULTADOS OBTIDOS COM O USO DE EXTRATOS DE RESÍDUO DE SEIVA DE *C. LECHLERI* 92
5.3.1 Teor de compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante dos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri* 92
5.3.2 Determinação de compostos fenólicos do resíduo de seiva de *C. lechleri* por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 104
5.4 OUTROS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PARA EXTRATOS DE CASCA, FOLHA E RESÍDUO DE *C. LECHLERI* 118
5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 120
6 CONCLUSÃO 125
REFERÊNCIAS 126

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas naturais pelos povos indígenas da Amazônia e seus descendentes vem despertando o interesse de pesquisadores a catalogar, caracterizar e extrair os produtos naturais desta região no intuito de desenvolver novos fármacos a partir dos compostos bioativos de plantas. O estudo e a avaliação dos compostos de plantas e de suas ações biológicas podem produzir potenciais fármacos para o combate de inúmeras doenças associadas ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio pelo organismo.

O uso desenfreado de fármacos sintéticos a partir do século XX ocasionou o aparecimento de infecções com resistência a antibióticos o que dificultou o combate aos microrganismos Nicolini et al. (2008). De acordo com Amini; Liu; Ahmad, (2017), em 2050, estima-se que as infecções causadas por microrganismos resistentes serão responsáveis por causar milhões de mortes e custarão aproximadamente 100 trilhões de dólares aos governos. Além disso, doenças como câncer, Alzheimer Wang et al. (2014) Parkinson Hwang (2013) e esclerose múltipla estão associadas ao aumento exagerado da produção de radicais livres e consequente estresse oxidativo no organismo.

Compostos bioativos de origem natural apresentam ação antioxidante capaz de reverter quadros de estresse oxidativo em patologias, além de possuírem ação contra agentes microbianos, o que torna a pesquisa por esses produtos o foco para a descoberta de moléculas com potencial ação biológica ACHKAR et al. (2013). Na indústria de alimentos, as plantas medicinais com propriedades antioxidantes têm sido utilizadas como opção de substituição aos antioxidantes sintéticos aos quais são atribuídos efeitos tóxicos e cancerígenos a longo prazo Ramalho; Jorge (2006).

As plantas de interesse farmacológico provenientes da Amazônia pertencentes ao gênero *Croton* são utilizadas pelos povos nativos como cicatrizantes, anti-inflamatórios e antibacterianos, das quais são utilizadas seiva, folhas e cascas para tais fins medicinais Alonso-Castro et al. (2012 e Montopoli et al. (2012 e Rossi et al. (2011). A *Croton lechleri* vem sendo pesquisada quanto a sua atividade antioxidante e antimicrobiana, bem como em relação à sua composição química no que diz respeito aos alcaloides.

Este estudo teve como objetivo otimizar o processo de extração das folhas, cascas e resíduo da extração da seiva de *C. lechleri* através do planejamento fatorial 2^3 e aplicando metodologia de superfície de resposta. Além disso, determinar o teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e a atividade antimicrobiana destes extratos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo definir as melhores condições de extração dos compostos fenólicos de cascas, folhas e resíduo da extração da seiva de *Croton lechleri*, caracterizar o perfil fenólico por CLAE e avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de seus extratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante, usando um delineamento fatorial 2^3 para avaliar o efeito do solvente, da temperatura e do tempo de extração em cascas, folhas e resíduo de seiva de *Croton lechleri*;
- Avaliar o teor de antocianinas e compostos fenólicos das amostras de cascas, folhas e resíduo de seiva de *Croton lechleri* na melhor condição de extração;
- Determinar as propriedades antioxidantes dos extratos de *C. lechleri* pelos métodos da redução do ferro - FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), sequestro dos radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina), ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico));
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos nos extratos de *Croton lechleri* por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar a atividade antimicrobiana das amostras pelo método de microdiluição, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus, Salmonella thyphimurium, Salmonella bongori, Escherichia coli, Bacillus subitilis, Candida albicans.*

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

A floresta amazônica, localizada nos países Brasil, Equador, Peru, Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Suriname e Venezuela Penna Filho (2013) é conhecida mundialmente pela diversidade da sua flora e fauna e abriga diversos povos indígenas os quais possuem conhecimentos adquiridos a gerações sobre as plantas medicinais da região Vásquez et al. (2014).

O uso de plantas medicinais é comum desde as civilizações mais antigas, seja no tratamento de doenças ou através de seus efeitos tóxicos. Entre os povos que registraram a utilização das plantas como meio de tratamento de doenças e como veneno estão os chineses, egípcios e gregos Firmo et al. (2011). As ações farmacológicas das plantas são devidas aos compostos ativos, os quais começaram a ser isolados no século XIV quando o homem passou a adentrar nas florestas desconhecidas em busca de novas fontes para o desenvolvimento de fármacos Cai et al. (1991).

De acordo com Dutra *et al.* (2016), a primeira patente de fármacos registrada data de 1897, com a síntese do ácido acetilsalicílico (aspirina) e incentivou a busca por novos compostos de plantas e, consequentemente, o crescimento da indústria farmacêutica em todos os continentes. No decorrer do século XX, o avanço da tecnologia e o desenvolvimento de técnicas químicas possibilitou o tratamento e cura de diversas doenças Junior (2008) fator fundamental no aumento da longevidade do homem.

A Organização Mundial de Saúde define planta medicinal como qualquer vegetal que possui substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos Veiga et al. (2005). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabelece fitoterápico como “produto obtido de planta medicinal, ou de seus derivados, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa” ANVISA (2011). A agência avalia a qualidade, segurança e eficácia de medicamentos

fitoterápicos no Brasil, afim de desvincular produtos de baixa qualidade e de risco tóxico CARVALHO et al. (2007).

3.2 *Croton lechleri*

Entre as plantas da família *Euphorbiaceae*, com cerca de 300 gêneros e 7500 espécies, *Croton lechleri* se destaca pelo uso medicinal há séculos pelas comunidades indígenas amazônicas Fão et al. (2012). A árvore de *Croton lechleri,* apresentada na Figura 1, pode atingir 20 metros de altura e suas folhas têm formato de coração e podem chegar a 30 centímetros de comprimento Jones (2003). A planta é encontrada nas regiões equatoriais da América latina que compreende México, Venezuela, Equador, Peru Alonso-Castro et al. (2012), Brasil Gupta et al. (2007), Colômbia e Bolívia Rossi et al. (2011). Popularmente conhecida como Sangue de Dragão, Sangre de Drago Ramírez et al. (2013), Dragon's Blood, Pocure, Racurana Rossi et al. (2011), Yawar Gradwascca e Quirari Jones (2003), a *C. lechleri* é uma árvore de porte médio que ocorre em áreas de até 1000 metros de altitude, sendo mais comumente encontrada entre 100 e 600 metros. Ao cortar-se o caule, um látex viscoso vermelho-carmim é secretado da casca da árvore, como mostra a Figura 2, explicando a origem de seu nome popular Montopoli et al. (2012).

Figura 1 - Árvore de *Croton lechleri*
Fonte: Useful tropical plants <http://tropical.theferns.info/image.php?id=Croton+lechleri>

Figura 2 – Corte do caule de *C. lechleri* para obtenção da seiva de coloração avermelhada.
Fonte: Useful tropical plants <http://tropical.theferns.info/image.php?id=Croton+lechleri>

Na medicina popular da região amazônica, a *C. lechleri* vem sendo utilizada a gerações pelas comunidades no tratamento de úlceras gástricas, diarreias, infecções, picadas de insetos, artrites Rossi et al. (2011), câncer Ramírez et al. (2013), cólera, hemorroidas Gupta et al. (2007), herpes Lopes et al. (2013), lesões digestivas Lopes et al. (2004) e como cicatrizante e analgésico Fão et al. (2012).

Estudos realizados com o látex, folha e casca provenientes desta espécie de planta indicam a presença de compostos bioativos das classes de compostos fenólicos e alcaloides, aos quais são atribuídas atividades antioxidante, antimicrobiana Gupta et al. (2007 e Jones (2003), anti-inflamatória Desmarchelier et al. (1997 e Fão et al. (2012 e Lopes et al. (2013), antitumoral Montopoli et al. (2012) e antiviral Ramírez et al. (2013 e Zevedo, Paula et al. (2015).

3.3 COMPOSTOS BIOATIVOS EM PLANTAS: PRESENÇA MAJORITÁRIA DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES

As plantas realizam metabolismo primário como forma de garantir suas necessidades energéticas metabólicas, através de fotossíntese e do transporte de solutos que suprem sua demanda. Além disso, quando as plantas se encontram em condições ótimas de sobrevivência, estas produzem os chamados compostos de metabolismo secundário, responsáveis por atividades biológicas de interesse farmacológico Skendi et al. (2017) cuja síntese pode sofrer variação de acordo com a interação de processos bioquímicos afetados por condições ambientais (YOGENDRA KUMAR et al., 2013). Nas plantas, os metabólitos secundários desempenham funções de proteção contra patógenos, atração para polinizadores e como agentes de simbiose e de competição com outras plantas. Estes compostos, formados por terpenos, fenólicos e alcaloides são de interesse farmacológico devido às suas ações como fitoterápicos e alta capacidade de doar hidrogênios e elétrons, agindo como antioxidantes (WANGENSTEEN et al., 2015).

Os antioxidantes são, por definição, um conjunto de substâncias (vitaminas, minerais, pigmentos naturais, enzimas e outros) que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres. Os principais antioxidantes de origem endógena (produzido pelo

organismo) podem ser a catalase, a glutationa peroxidase, a albumina e a glutationa, entre outros, ou exógena (proveniente da dieta), tais como tocoferol, carotenoides, zinco, cobre, selênio e compostos fenólicos. A respiração aeróbia produz radicais livres que são neutralizados pelos antioxidantes presentes no organismo. Os compostos antioxidantes agem na proteção do organismo contra o ataque dos radicais livres sobre os lipídeos, proteínas e aminoácidos Ali et al. (2014 e Kumar et al. (2017).

Quando a quantidade de radicais livres gerada no organismo é maior do que dos antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo das células, que consiste na geração de espécies reativas de oxigênio como radical hidroxila, ânion radical superóxido e hidroperoxila, responsáveis pelo envelhecimento, doenças degenerativas, disfunções cerebrais e por causar danos ao DNA Salar et al. (2016). Compostos com potencial ação terapêutica têm sido estudados para o combate a produção de radicais livres e podem ser provenientes de plantas.

Os antioxidantes de origem naturais mais importantes são denominados compostos fenólicos, os quais são formados por pelo menos um grupo benzênico e substituintes hidroxilas, que possuem propriedades óxi-redutoras e tem a capacidade de estabilizar os compostos intermediários formados Mokrani; Madani (2016). Os compostos fenólicos se destacam por estarem presentes em grandes quantidades nos vegetais encontrados principalmente nas folhas, frutos e sementes e são potentes doadores de hidrogênio o que lhes confere alto poder antioxidante Mokrani; Madani (2016). Entre os compostos fenólicos encontram-se ácido fenólicos e flavonoides. Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico ligado à um grupo carboxílico e hidroxilas ou metoxila Soares (2002). Os mesmos são divididos em hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos De Oliveira; Bastos (2011). A estrutura dos flavonoides é constituída por dois anéis aromáticos ligados por três carbonos, totalizando 15 carbonos em configuração C_6-C_3-C_6 (Figura 3) e os mais encontrados são as flavonas, as flavanonas, as catequinas, as isoflavonas e as antocianinas Durga et al. (2014).

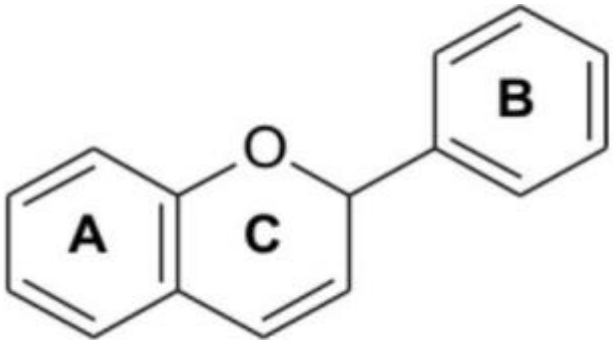

Figura 3 – Estrutura química dos flavonoides.
Fonte: ANGELO; JORGE, (2007).

Na indústria de alimentos, os radicais livres são responsáveis pelos processos de oxidação e degradação lipídica (CANABADY-ROCHELLE et al., 2015), formando compostos indesejáveis tais como aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, álcoois e ésteres Ferrari (1998). A indústria de alimentos utiliza compostos antioxidantes para garantir a estabilidade de produtos, evitando sua deterioração e aumentando a vida de prateleira dos mesmos. Os compostos sintéticos como BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butil-hidroxi-tolueno), TBHQ (terc-butil-hidroxi-quinona) e GP (galato de propila) são mais utilizados pela indústria devido a sua eficácia em baixas quantidades, além de baixo custo e maior facilidade de obtenção. No entanto, pesquisas têm demonstrado que estes antioxidantes sintéticos apresentam efeitos tóxicos em altas concentrações e seu uso vem sendo questionado Ambigaipalan (2015 e Ghimire et al. (2017). Deste modo, os pesquisadores das áreas de alimentos e produtos naturais vêm buscando compostos antioxidantes que possam ser extraídos de fontes naturais e não ofereçam riscos na substituição dos antioxidantes sintéticos.

3.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

Na análise de plantas medicinais, o processo de extração pelo qual a planta é submetida é determinante na eficácia e quantificação dos compostos de interesse farmacológico. A extração de compostos bioativos de plantas é determinada pelas

fases de preparação (como lavagem, secagem, moagem e congelamento), extração com solvente e separação Sasidharan et al. (2011). Nas fases de lavagem, secagem e moagem é essencial que as plantas não passem por processos com temperaturas elevadas, afim de não deteriorar os compostos alvo de extração ACHKAR et al. (2013). Em relação ao solvente empregado, deve-se haver um estudo prévio para se determinar a polaridade do extrato a ser preparado Naczk; Shahidi (2006).

Os métodos de extração de compostos de plantas com o uso de solventes podem incluir aquecimento, agitação, percolação, micro extração, extração com fluído supercrítico, entre outros Sasidharan et al. (2011). A temperatura e o tempo de extração também são determinantes no rendimento dos compostos de interesse. Segundo Naczk; Shahidi, (2006) o tempo de extração pode variar de 1 minuto a 24 horas, porém períodos mais longos aumentam as chances de oxidação dos fenólicos presentes na amostra. Além disso, altas temperaturas podem degradar compostos químicos de interesse ACHKAR et al. (2013). De acordo com Rockenbach *et al. (*2008), não há consenso entre autores na determinação de método mais eficiente para a extração de compostos fenólicos de plantas, sendo que o rendimento e composição do extrato obtido por solvente depende tanto do solvente utilizado como do método empregado.

Na extração de compostos bioativos de plantas, os solventes mais comumente empregados são água, metanol, etanol e suas combinações Alam et al. (2013). O uso de etanol e água com proporções diversas são bastante utilizados devido à larga abrangência de extração de compostos fenólicos e por ser de baixo custo Alothman et al. (2009).

De modo a estudar o impacto que o solvente, a temperatura e o tempo causam na extração de compostos bioativos, o planejamento fatorial faz-se necessário para reduzir o número de ensaios, buscando a otimização do processo de extração. Além disso, a Metodologia de Superfície de Resposta e a Análise de Componentes Principais surgem como ferramentas de análise nos teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante, de modo a viabilizar a leitura dos dados obtidos.

3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Na determinação dos compostos fenólicos totais (CFT) é empregado o método que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu. A técnica é baseada na espectrometria UV-VIS do extrato da amostra e os CFT são quantificados a partir dos valores de absorbância empregado na curva padrão de ácido gálico, um antioxidante natural. Oliveira et al. (2009) aponta que o método consiste na mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico, de cor amarela no complexo $Na_2MoO_4.2H_2O$ e que, ao sofrer redução pelos compostos fenólicos formam complexos de molibdênio-tungstênio azuis $[(PMoW_{11}O_4)^{4-}]$. A Figura 4 mostra a reação entre o ácido gálico (padrão antioxidante) e o reagente Folin-Ciocalteu.

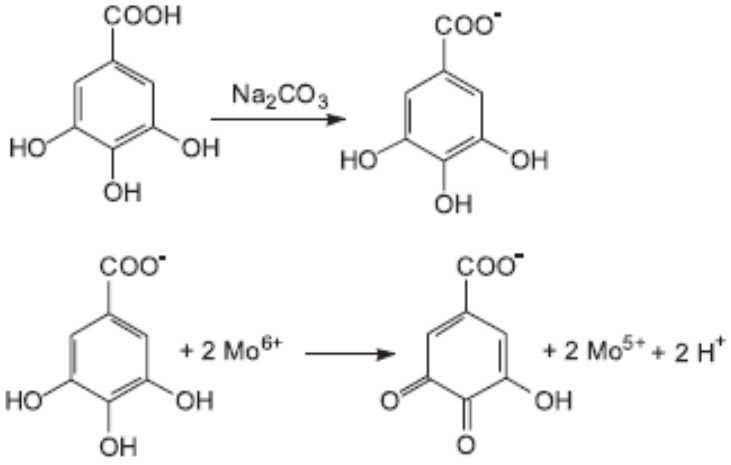

Figura 4 – Reação entre o reagente Folin-Ciocalteu e o ácido gálico.
Fonte: OLIVEIRA et al, (2009).

3.6 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Chiang et al. (2017) define antioxidante como compostos com a capacidade de diminuir, inibir ou prevenir a oxidação de materiais através do sequestro de radicais livres e diminuindo o estresse oxidativo. Os diferentes tipos de radicais livres

atuam nos organismos de maneiras distintas, exigindo que os antioxidantes sejam capazes de reduzi-los e dessa maneira neutralizar sua ação.

Devido aos diferentes mecanismos de ação antioxidante, a atividade antioxidante de um composto pode ser determinada por inúmeros métodos *in vitro,* dentre os quais estão o sequestro dos radicais DPPH e ABTS, co-oxidação de β-caroteno e ácido linoleico, sequestro do peróxido de hidrogênio, sequestro do radical peroxil, entre outros Oliveira et al. (2009).

3.6.1 Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A determinação da atividade antioxidante é largamente empregada devido sua simplicidade, rapidez e alta reprodutibilidade. O radical DPPH (violeta) é reduzido a hidrazina (amarelo) pelo composto antioxidante que age como doador de hidrogênios (Figura 5) e a sua atividade é quantificada por espectrofotometria Mokrani; Madani (2016) com o uso de curva padrão de Trolox, um composto análogo a vitamina E, solúvel em fases polares e apolares Pietta (2000). A outra forma de determinar a atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH é através da quantidade de antioxidante necessário para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50 % (EC_{50}).

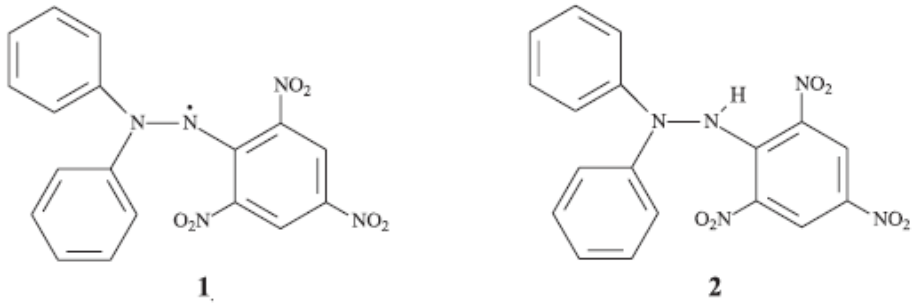

Figura 5 - Estrutura radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH.
Fonte: ALVES et al. (2010).

3.6.2 Sequestro do radical 2,2-azino-bis (3-benzotiazolina-6ácido sulfônico) (ABTS)

O radical ABTS é utilizado na determinação da atividade antioxidante de compostos polares e apolares. O método é baseado na geração de radical ABTS que é reduzido pelo antioxidante, como exemplifica a Figura 6 Salar et al. (2016) e, assim como no método DPPH, a sua atividade é quantificada por espectrofotometria com o uso de curva padrão de Trolox.

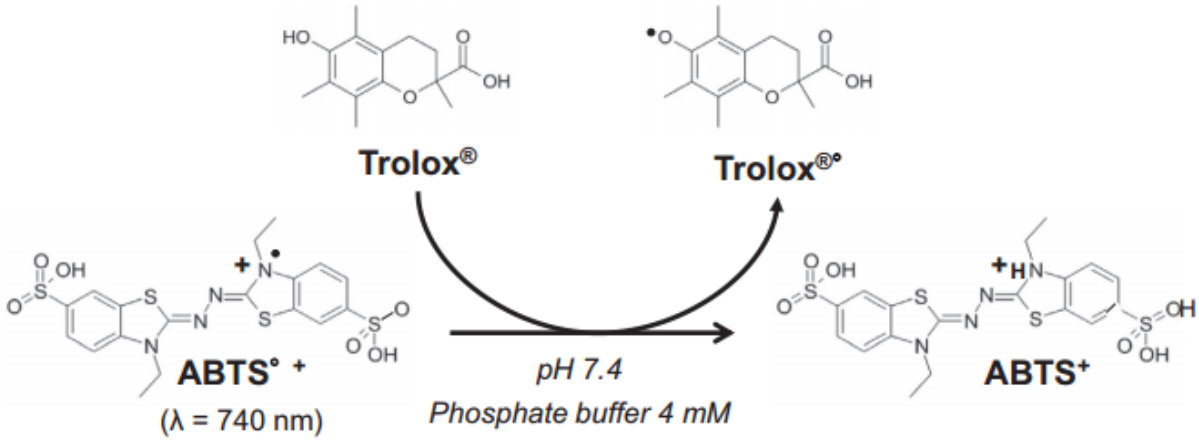

Figura 6 – Reação entre o radical ABTS e o antioxidante sintético Trolox.
Fonte: CANABADY-ROCHELLE et al. (2015).

3.6.3 Poder antioxidante redutor do ferro (FRAP)

O método de determinação da atividade antioxidante pela redução do ferro é comumente empregado para extratos de vegetais e consiste na redução do ferro férrico para ferroso na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) Alam et al. (2013) em presença de tampão ácido e forma um complexo de coloração azul (como mostra a Figura 7) cuja absorbância é determinada a partir de uma curva de calibração preparada com sulfato ferroso.

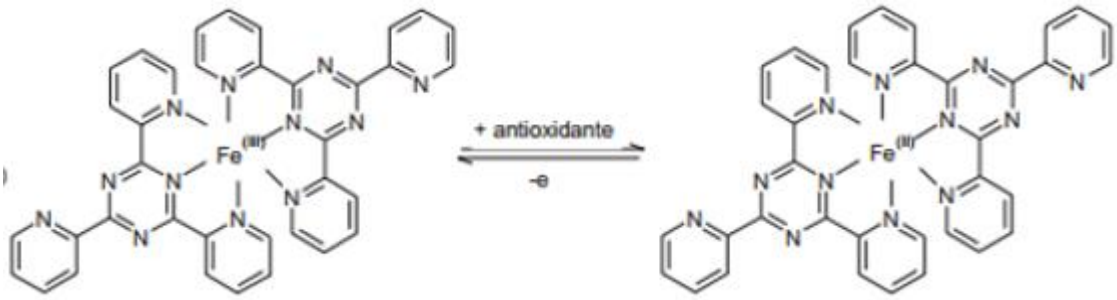

Figura 7 – Redução do Fe^{3+} na presença de TPTZ.
Fonte: RUFINO et al. (2006).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 8 mostra o fluxograma das atividades desenvolvidas neste estudo com as cascas, folhas e resíduo da seiva de *Croton lechleri.*

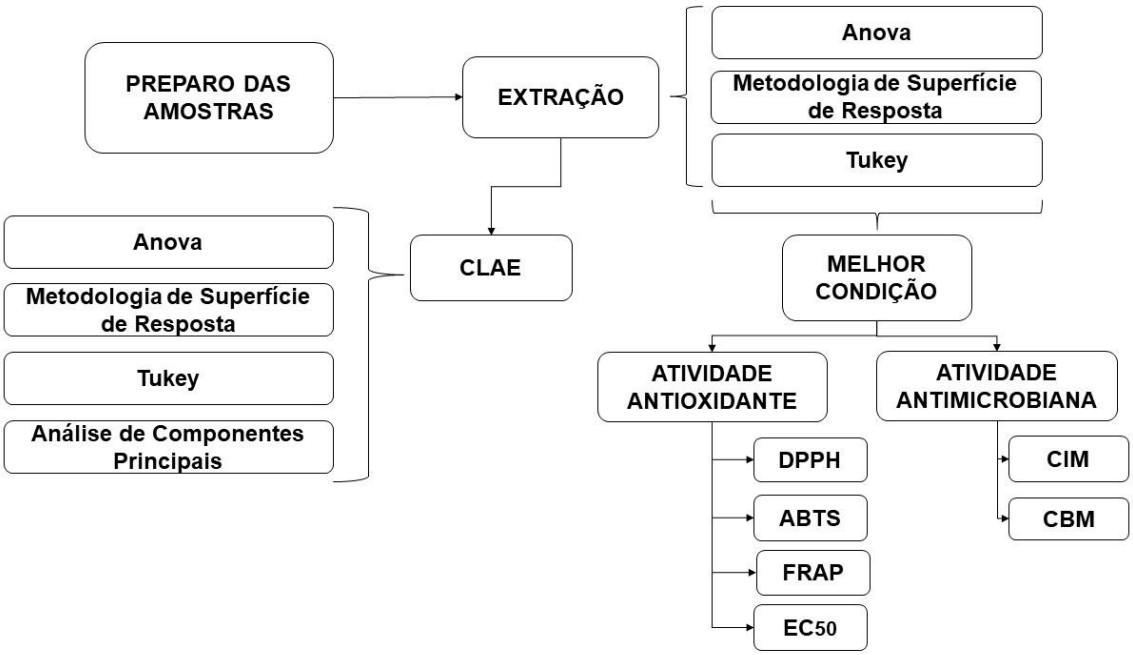

Figura 8 – Fluxograma de atividades.

4.1 AMOSTRAS

As amostras de casca, folha e resíduo de seiva de *Croton lechleri* (Figura 9) foram cedidas por SCHWAAB COMPANY – Pesquisa Indústria de Comércio e Exportação e Importação de Produtos da Amazônia LTDA, com sede em Porto Velho – Rondônia – Brasil. O resíduo da seiva é a borra da seiva desidratada, uma porção que decanta e se adere ao recipiente utilizado na coleta da seiva formando um resíduo amorfo.

As amostras de folhas, cascas e resíduo de *C. lechleri*, foram coletadas no primeiro trimestre de 2016 e secas em estufa a 35-40 ºC durante 12 horas, e então

moídas em moinho de facas Pulverisette 14 em 6000 rpm e armazenadas em freezer a -12 ºC para posterior análises.

Figura 9 – Amostras de folhas, cascas e resíduo da seiva de *C. lechleri.*
Fonte: Autoria própria.

4.2 EXTRAÇÃO E DELINEAMENTO FATORIAL 2^3

Um delineamento fatorial 2^3 foi utilizado para avaliar o efeito do solvente, da temperatura e do tempo na extração de compostos bioativos das amostras. O delineamento foi composto de 8 corridas em triplicata. As variáveis independentes utilizadas foram etanol e água (X1), tempo de 30 e 90 min (X2) e temperatura de extração (35 e 70 ºC) (X3), (Tabela 1), enquanto que a as variáveis dependentes foram o teor de compostos fenólicos totais pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocateau (Y1) e a atividade antioxidante pelo do método do sequestro do radical DPPH expresso em mg de Trolox g^{-1} de amostra (Y2) para os extratos de cascas e folhas (Tabela 2). Para a análise do resíduo da seiva, devido à sua

coloração púrpura, característica de antocianinas, a variável independente teor de antocianinas monoméricas (Y3) foi adicionada as demais.

Os compostos bioativos foram extraídos através da adição de 30 mL de solvente e 3 g de amostra em Erlenmeyer e utilizado incubadora shaker durante o tempo determinado no delineamento fatorial. A mistura foi adicionada em tubo falcon e seguiu para centrifugação a 1500 rpm para separar a fase sólida. A fase líquida foi filtrada em papel filtro qualitativo e o filtrado recolhido para análises.

Tabela 1 - Delineamento fatorial 2^3 para a extração dos compostos com bioatividade em folhas, cascas e resíduo da seiva de *C. lechleri.*

	Variáveis codificadas			**Variáveis reais**		
Ensaios	X1	X2	X3	Solvente	Tempo (min.)	Temperatura (°C)
A	-1	-1	-1	Etanol	30	35
B	+1	-1	-1	Água	30	35
C	-1	+1	-1	Etanol	90	35
D	+1	+1	-1	Água	90	35
E	-1	-1	+1	Etanol	30	70
F	+1	-1	+1	Água	30	70
G	-1	+1	+1	Etanol	90	70
H	+1	+1	+1	Água	90	70

Tabela 2 - Variáveis dependentes e independentes do delineamento fatorial 2^3 para extração dos compostos bioativos das folhas, cascas e resíduo da seiva de *C. lechleri*.

Variável		**-1**	**+1**
X1	Solvente	Etanol	Água
X2	Tempo	30 min	90 min
X3	Temperatura	35 ºC	70 ºC
Y1	CFT		
Y2	AA (DPPH)		
Y3	Antocianinas		

-1 e +1 são níveis para delineamento fatorial

O software Statistica® foi utilizado para análise estatística dos dados através de análise de variância (ANOVA). O software estatístico foi utilizado para análise

estatística e análise estatística (ANOVA). Os dados experimentais foram analisados para se adequarem à regressão polinomial de segunda ordem contendo coeficientes lineares e quadráticos e efeitos de interação de dois fatores. Os modelos e os coeficientes de regressão foram considerados significativos quando os valores de p foram inferiores a 0,05.

Para avaliar os efeitos dos fatores sobre as variáveis dependentes, foram utilizados gráficos de Pareto e Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), visando determinar a melhor condição de extração dos compostos fenólicos com atividade antioxidante.

4.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Os extratos produzidos a partir da condição otimizada foram submetidos à filtração em filtro 0,45 µm (Millipore, Massachusetts, USA) e 10 µL foram injetados em fluxo de 1 $mLmin^{-1}$ em cromatógrafo líquido (Varian Inc. Walnut Creek, C.A US) acoplado a detector de fluorescência com comprimento de onda de 280 e 310 nm e detector de arranjo de fotodiodos para a identificação dos compostos fenólicos. Na análise cromatográfica, foi empregada coluna de fase reversa C-18 (250 mm X 4,6 mm X 5 µm) mantida a 30 ºC. A fase móvel foi composta por água acidificada com ácido acético 2% (fase A) e água: acetonitrila: ácido acético (58:40:2) (fase B) com eluição modo gradiente, de acordo com a Tabela 3. Para obter a concentração dos compostos nas amostras, foram construídas curvas de calibração utilizando regressão linear, relacionando a área dos sinais dos padrões analíticos com a qual foram empregados. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram determinados através da injeção de padrão analítico em diferentes concentrações, preparadas através de diluições da solução da mistura dos padrões de trabalho. O LD e o LQ para cada composto, nas diferentes curvas de calibração foram obtidos a partir do desvio padrão do intercepto (S) e da média da inclinação da curva de calibração (b). A concentração dos compostos identificados foi expressa em µg mL. Foram investigados os compostos fenólicos segundo os padrões ácido

gálico, ácido cumárico, ácido siríngico, ácido ferrúlico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido salicílico, ácido transcinâmico, catequina e epicatequina.

Tabela 3 – Gradiente de eluição das fases A (água acidificada com ácido acético 2%) e B (água: acetonitrila: ácido acético (58:40:2) no isolamento e quantificação dos compostos fenólicos extraídos das folhas, cascas e resíduo da seiva de *C. lechleri*.

Tempo (min.)	Fase A (%)	Fase B (%)
0 - 2	95	5
2 – 15	80	20
15 – 25	75	25
25 - 47	15	85

4.4 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado através do método Folin-Ciocalteau (SINGLETON, 1999). A determinação ocorreu a partir de uma alíquota de 0,5 mL dos extratos transferido para um tubo com rosca contendo 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau diluído em água na proporção 1:10. Após 5 minutos, foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio 4% e os tubos foram mantidos em repouso por 2 horas ao abrigo da luz até a leitura em espectrofotômetro a 740 nm. Como padrão de referência, utilizou-se o ácido gálico para a curva padrão e os resultados foram expressos em mg equivalente em ácido gálico por grama da amostra (EAG/g).

4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1 Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A determinação da atividade antioxidante e a metodologia DPPH foi expressa em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (µmol TEACg^{-1}) pela captura do

radical livre DPPH segundo a metodologia de alothman; Bhat; Karim, (2009). Adicionou-se a um tubo de ensaio 0,5 mL do extrato, 3,0 mL de etanol PA e 0,3 mL de DPPH e a mistura foi mantida ao abrigo da luz durante 30 minutos até a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. As análises foram realizadas em triplicata. Para expressar a atividade antioxidante a como equivalente ao Trolox, a curva padrão de Trolox foi estabelecida nas concentrações de 0,0075, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,0625 µmol de Trolox. Para expressar a atividade antioxidante em EC_{50}, uma curva cinética foi plotada, avaliando o tempo de estabilização do radical DPPH e a porcentagem de atividade antioxidante (%AA) calculada de acordo com a Equação 1.

$$\%AA = 100 - \left[\frac{\left(Abs(amostra) - Abs(branco)\right)x100}{Abs(controle)}\right] \qquad \text{(Eq. 1)}$$

4.5.2 Sequestro do radical 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)

A atividade antioxidante pelo método ABTS é descrita por Floegel *et al.*, (2011), que determina a atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)). O radical foi gerado pela reação do $ABTS^{+\cdot}$ (7 µmol) com persulfato de potássio 140 mM mantida por 16 horas ao abrigo da luz em temperatura ambiente e diluída em etanol a absorbância de 0,7 em comprimento de onda de 734 nm. À solução de ABTS foi adicionado o extrato e sua absorbância foi verificada após 6 minutos de repouso. A atividade antioxidante da amostra foi calculada em relação ao antioxidante sintético Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) e os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (µmol $TEACg^{-1}$). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5.3 Poder antioxidante redutor do ferro (FRAP)

Na determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro, utilizou-se a metodologia descrita por (Rufino *et al.*, 2006). A um tubo de ensaio, foram adicionados 0,1 mL do extrato e 30 mL do reagente FRAP e o mesmo foi mantido em banho-maria a 37 ºC por 30 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Para a determinação da atividade antioxidante, foi empregada a curva padrão do sulfato ferroso de concentrações 200, 500, 1000, 1500, 2000 µM. Os resultados, obtidos em triplicata, foram expressos em µmol Fe^{2+} mg^{-1}.

4.6 TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS

As antocianinas foram determinadas pelo método de diferença de pH descrito pela AOAC (2005). Foram transferidas para um tubo de ensaio uma alíquota de 0,5 mL do extrato, 2,0 mL de solução tampão cloreto de potássio de pH 1,0. Em outro tubo, foram adicionados 0,5 mL do extrato e 2,0 mL da solução tampão acetato de sódio (pH 4,5). A leitura em espectrofotômetro foi realizada a 520 e 700 nm após 20 minutos de reação. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como miligrama por 100 gramas de amostra (mg $100g^{-1}$) e calculados pela Equação 2:

$$Antocianinas\left(\frac{mg}{100g}\right) = \frac{A.MW.DF.10^3}{\varepsilon.1} \qquad (\mathrm{Eq.}\,2)$$

Onde A representa a diferença de absorbância entre pH 1,0 e pH 4,5; MW é o peso molecular da cianidina-3-gligosídio, que representa 449,2 g/mol; DF é a

diluição da amostra; ε representa a absortividade molar da cianidina-3-gligosídio, igual a 26900 L/mol.cm³); 10^3 é o fator de conversão de g para mg.

4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana de extratos de plantas é utilizada para testar o potencial de inibição e bactericida/fungicida dos mesmos. Na determinação da atividade antimicrobiana de extratos são empregados métodos baseados na inoculação de cepas registradas de microrganismos patogênicos em meios enriquecedores e/ou diferenciais. A técnica utilizada foi a de micro diluição em caldo. A vantagem da técnica de micro diluição é o baixo custo devido à pouca quantidade de meio de cultura, reprodutibilidade e a determinação da Concentração Inibitória Mínima do extrato para os microrganismos testados.

Na determinação da atividade antimicrobiana foram verificadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos do resíduo sólido e da seiva. A metodologia utilizada foi descrita por CLSI (2005) e os extratos foram testados frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus, Salmonella thyphimurium, Salmonella bongori, Escherichia coli, Bacilus subitilis, Candida albicans.*

4.7.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

As CIM dos extratos e da seiva foram determinadas pelo método de diluição em microplacas de 96 poços. As concentrações dos extratos e da seiva foram variadas de 0,16 a 5,00 mg mL^{-1}. Os microrganismos foram reativados a partir de células liofilizadas em caldo infusão cérebro coração (BHI) por 24 horas a temperatura de 37 ºC e repicadas em placas de Petry contendo ágar BHI e incubadas a 24 horas a 37 ºC. As colônias individuais presentes na placa foram adicionadas, com o auxílio de alça de platina, à solução de NaCl 0,89% esterilizado.

A mistura foi homogeneizada em Vórtex e ajustada em espectrofotômetro para a absorbância de 0,135 a 660 nanômetros, o que corresponde a 1-2 x 10^8 UFC.mL^{-1} na escala de Mc Farland. Posteriormente, 50 µL da suspensão bacteriana foram adicionados a 50 mL de caldo BHI para obter a concentração de 1-2x10^5 UFC.mL^{-1}.

Na microplaca, foram adicionados 190 µL de caldo BHI inoculado e 10 µL dos extratos e seiva nas concentrações variadas e as mesmas foram incubadas em incubadora por 24 horas a 37 ºC. Nos controles foram adicionados ao caldo BHI inoculado, o antibiótico clorafenicol 0,12% e os solventes nas concentrações utilizadas. Como revelador foi utilizado o corante resazurina. As análises foram realizadas em triplicatas e considerados como testes positivos os poços em que não houve mudança na coloração azul do corante resazurina.

4.7.2 Concentração bactericida mínima (CBM)

Os poços da microplaca considerados positivos na determinação da CIM foram utilizados na CBM. Com o uso de um tubo capilar, uma gota proveniente de cada poço positivo foi inoculada em placa de Petri contendo ágar BHI que foram mantidas em estufa a 37 ºC por 24 horas. As análises foram realizadas em triplicata e a CBM foi considerada a menor concentração sem crescimento microbiano visível.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através de ANOVA seguido pelo teste de Tukey e considerado $p<0.05$ como diferença estatística significativa entre os grupos. Todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. A análise de componentes principais (PCA) foi empregada aos resultados da análise de cromatografia de maneira a se determinar o padrão característico das amostras

(tratamentos) em função da diversidade de compostos com atividade antioxidante presentes em *C. lechleri*.

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS OBTIDOS COM O USO DE EXTRATOS DE CASCA DE *C. LECHLERI*

5.1.1 Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante nas cascas de *C. lechleri*

O teor de compostos fenólicos totais nos extratos de cascas variou de 8,55 a 46,57 mg EAGg^{-1} enquanto que a atividade antioxidante variou de 49,23 a 283,10 µmol de Trolox.g^{-1}, conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados obtidos referente ao delineamento fatorial para CFT (mg EAG g^{-1}) e AA (µmol Trolox g^{-1}) em extratos da casca de *C. lechleri.*

Ensaios	Variáveis			Casca	
	X1	X2 (min.)	X3 (°C)	TCF (mg EAG/g)	AA (µmol Trolox/g)
A	Etanol	30	35	8,55 ± 0,03 ^{h}	49,25 ± 0,57 ^{g}
B	Água	30	35	35,64 ± 0,17 ^{f}	193,88 ± 1,08 ^{d}
C	Etanol	90	35	13,38 ± 0,01 ^{g}	81,17 ± 0,22 ^{f}
D	Água	90	35	38,02 ± 0,05 ^{e}	200,66 ± 0,38 ^{c}
E	Etanol	30	70	39,46 ± 0,01 ^{d}	283,11 ± 0,29 ^{a}
F	Água	30	70	41,19 ± 0,12 ^{b}	206,62 ± 0,28 ^{b}
G	Etanol	90	70	46,57 ± 0,08 ^{a}	280,12 ± 2,29 ^{a}
H	Água	90	70	40,42 ± 0,08 ^{c}	152,65 ± 2,21 ^{e}

Pela análise de variância (ANOVA) mostrada na Tabela 5, para a extração de compostos bioativos em cascas de *C. lechleri*, os três fatores analisados (solvente, tempo e temperatura de extração) foram significativos para as variáveis dependentes compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Além disso, as interações solvente e tempo de extração, solvente e temperatura foram significativas

para o teor de CFT para casca, enquanto que interação tempo e temperatura de extração, por sua vez, mostrou-se significativa para atividade antioxidante.

Tabela 5– Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis dependentes CFT e AA em extratos da casca de *C. lechleri.*

Fatores	**Compostos fenólicos**				
	Soma dos Quadrados	**G.L.**	**Média dos Quadrados**	**F-calculado**	**p-valor**
Solvente (X1)	839.120	1	839.120	1274.597	**0.000000**
Tempo (X2)	68.736	1	68.736	104.408	**0.000000**
Temperatura (X3)	1946.617	1	1946.617	2956.850	**0.000000**
X1; X2	39.948	1	39.948	60.680	**0.000001**
X1; X3	1182.778	1	1182.778	1796.602	**0.000000**
X2; X3	0.283	1	0.283	0.430	0.520752
Resíduo	0.117	16			
Total	4088.674	23			
Fatores	**Atividade Antioxidante**				
	Soma dos Quadrados	**G.L.**	**Média dos Quadrados**	**F-calculado**	**p-valor**
Solvente (X1)	1357.3	1	1357.33	83.877	**0.000000**
Tempo (X2)	125.0	1	124.97	7.722	**0.012863**
Temperatura (X3)	59265.6	1	59265.60	3662.355	**0.000000**
X1; X2	2173.1	1	2173.10	134.288	**0.000000**
X1; X3	82162.3	1	82162.33	5077.273	**0.000000**
X2; X3	3431.8	1	3431.76	212.068	**0.000000**
Resíduo	24.1	16			
Total	148790.2	23			

A significância de cada modelo para cada variável também pode ser observada pelo valor de F, e sempre que o $F_{calculado}$ for maior que o $F_{tabelado}$ denota diferença significativa para determinado fator. Na Tabela 5 nota-se que, para todos fatores considerados significativos, o $F_{calculado}$ apresentou valores muito maiores do que o $F_{tabelado}$:4,45. Desta forma, por exemplo, em cascas de *C. lechleri*, a maior diferença foi encontrada no fator temperatura para a variável dependente fenólicos

totais, chegando a ser 664 vezes maior que o $F_{tabelado}$, enquanto que para a variável atividade antioxidante, a interação das variáveis solvente-temperatura atingiu a maior diferença, chegando a ser 1140 vezes maior que o $F_{tabelado}$.

Outra maneira de se observar os resultados descritos na Tabela 5 é através dos gráficos de Pareto, apresentados pela Figura 10. Este tipo de gráfico mostra o efeito dos fatores: tipo de solvente, tempo e temperatura de extração sobre as respostas analisadas. O valor de $t_{tabelado}$ (2,11) utilizado no gráfico de Pareto é obtido através dos graus de liberdade do resíduo apresentado nas tabelas de ANOVA ao nível de significância de 5%. Resultados com valores de t abaixo do tabelado são considerados não significativos ($t_{calculado}<t_{crítico}$). Os valores absolutos do $t_{calculado}$ fornecem as alturas das barras, que por sua vez, estão dispostas de modo crescente. O valor de $t_{tabelado} = t_{(17;5\%)} = 2{,}11$ complementa o diagrama, fornecendo a partir de qual valor os efeitos são significativos (RODRIGUES e IEMMA, 2014).

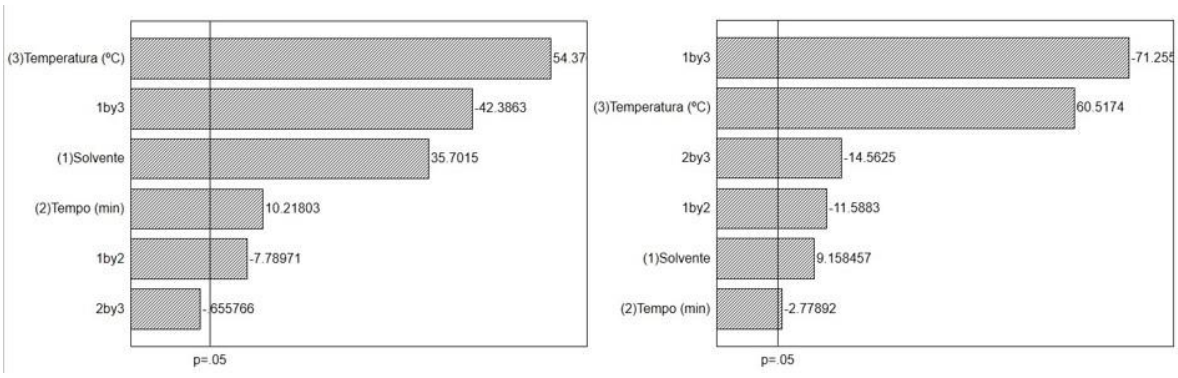

Figura 10 - Gráficos de Pareto para CFT (esquerda) e AA (direita) dos extratos de casca de *C. lechleri.*

A partir dos gráficos de Pareto mostrados na Figura 10 pode-se observar que somente a interação tempo e temperatura não foi significativa ($p<0{,}05$) para o teor de CFT dos extratos de casca de *C. lechleri*. Além disso, tanto para o teor de CFT quanto para AA (DPPH), a temperatura e sua interação com o solvente foram os fatores mais significativos para os resultados ($p<0{,}05$).

Os resultados obtidos foram também analisados por regressão linear múltipla, e por meio desta, foram gerados modelos ajustados levando em consideração

somente os efeitos significativos para as variáveis dependentes fenólicos totais e atividade antioxidante para cascas de *C. lechleri*.

Tabela 6 - Modelos gerados por regressão linear múltipla para as variáveis dependentes, compostos fenólicos (CFT) e atividade antioxidante (AA) em função dos fatores; tipo de solvente, tempo e temperatura.

Equação	Modelo Gerado	Coeficiente de Correlação (R^2)
3	$CFT\ cascas^1 = 32.90 + 5.91\ x_1 + 1.69\ x_2 + 9.01\ x_3 - 1.29 x_1 x_2 - 7.02 x_1 x_3$	0.997
4	$AA\ cascas^1 = 180.93 + 7.52 x_1 - 2.28 x_2 + 49.69\ x_3 - 9.52\ x_1 x_2 - 58.51\ x_1 x_3 - 11.96\ x_2 x_3$	0.998

Respostas: CFT: compostos fenólicos totais; AA: atividade antioxidante.

Cada modelo de regressão linear múltipla pode gerar uma superfície de resposta, como mostra a Figura 11. Nas superfícies de resposta, as variáveis dependentes analisadas, compostos fenólicos, atividade antioxidante e antocianinas estão mostradas (eixo z) em função das variáveis independentes (fatores) tipo de solvente, tempo e temperatura de extração. Os valores de coeficiente de correlação próximos a 0,99 indicam que os modelos utilizados se ajustam aos dados experimentais.

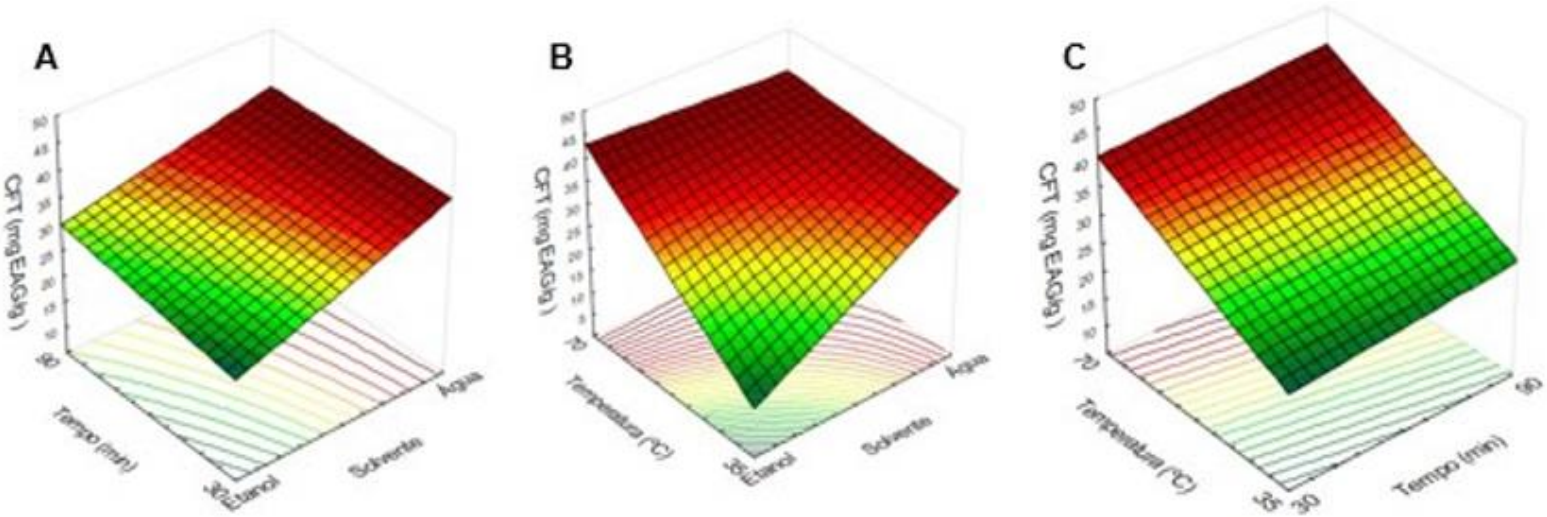

Figura 11 - Gráficos de superfície para compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos obtidos da casca de *C. lechleri.* (A: solvente e tempo; B: solvente e temperatura; C: tempo e temperatura).

Para o teor de CFT obtidos a partir da casca de *C. lechleri*, a água apresenta-se como melhor solvente extrator, e temperatura de 70 ºC mostram-se como níveis mais eficientes para extração de compostos fenólicos.

Para a variável dependente AA do extrato de casca de *C. lechleri,* o etanol apresentou maiores valores de atividade antioxidante, juntamente do emprego de 70 ºC como temperatura de extração.

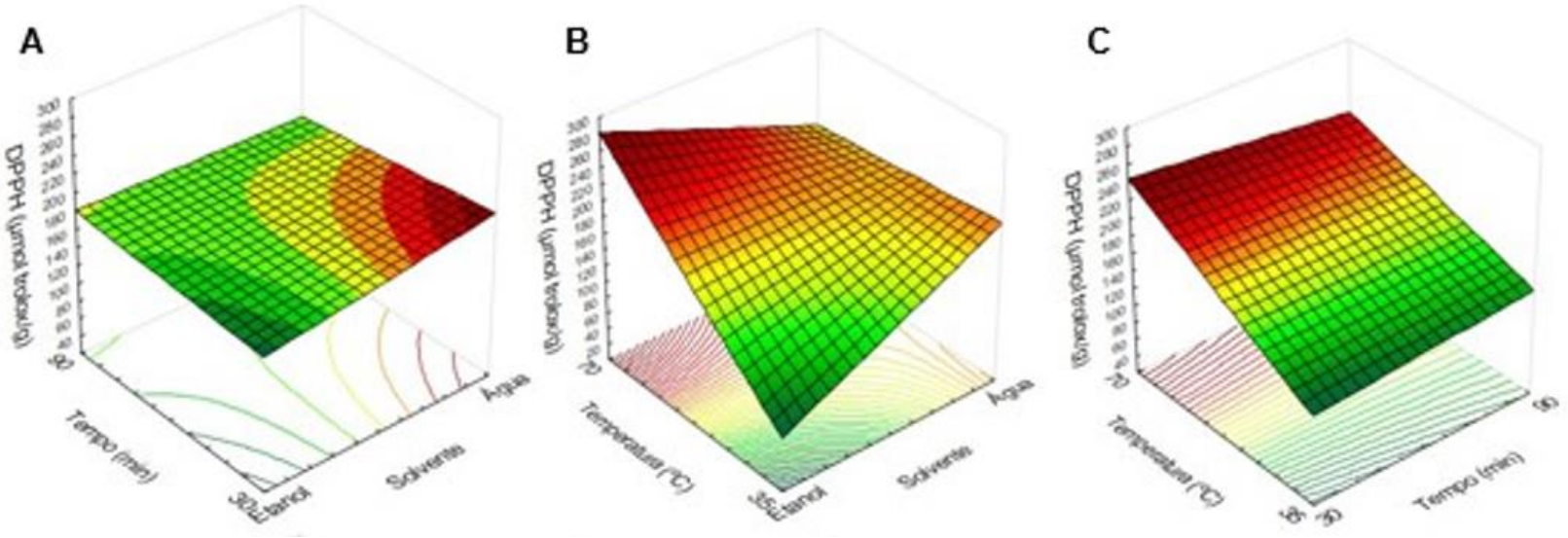

Figura 12 - Gráficos de superfície para atividade antioxidante (AA) dos extratos obtidos da casca de *C. lechleri.* (A: solvente e tempo; B: solvente e temperatura; C: tempo e temperatura).

5.1.2 Determinação de compostos fenólicos da casca de *C. lechleri* por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os extratos obtidos com a casca de *C. lechleri* foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a identificação e quantificação de compostos fenólicos presentes nos mesmos. Nos extratos obtidos com a casca foram identificados os seguintes compostos fenólicos: ácido gálico, ácido siríngico, catequina e epicatequina. A Tabela 7 mostra os compostos fenólicos identificados por CLAE obtidos para o extrato de casca nas condições de extração.

Tabela 7 – Perfil dos compostos fenólicos quantificados por CLAE nos extratos de casca de *C. lechleri.*

Ensaio	**Ácido gálico (μgg^{-1})**	**Catequina (μgg^{-1})**	**Epicatequina (μgg^{-1})**	**Ácido siríngico (μgg^{-1})**
LD (μgg^{-1})	1,70	33,29	2,580	2,22
LQ (μgg^{-1})	5,67	110,95	8,59	7,40
TR (min.)	3,24 ± 0,28	8,51± 0,89	13,73 ± 0,77	13,06 ± 0,14
λ (nm)	272	260 e 290	276	274
A	36,56 ± 2,4 ^{b}	434,35 ± 5,2 ^{c}	15,84 ± 1,0 ^{f}	nd
B	78,13 ± 9,9 ^{a}	131,53 ± 5,8 ^{c}	25,29 ± 0,9 ^{d}	26,94 ± 1,0 ^{c}
C	42,64 ± 1,7 ^{b}	119,74 ± 2,3 ^{c}	19,77 ± 0,7 ^{ef}	nd
D	43,60 ± 0,1 ^{b}	466,43 ± 4,5 ^{c}	42,22 ± 0,3 ^{a}	55,02 ± 0,7 ^{a}
E	15,11 ± 0,9 ^{c}	869,18 ± 4,2 ^{b}	30,89 ± 2,5 ^{c}	nd
F	47,22 ± 1,0 ^{b}	414,69 ± 2,0 ^{c}	24,37 ± 0,8 ^{de}	26,62 ± 2,0 ^{c}
G	nd	1241,83 ± 14,8 ^{a}	36,33 ± 0,7 ^{b}	nd
H	19,66 ± 0,5 ^{c}	377,80 ± 5,7 ^{c}	29,26 ± 2,1 ^{cd}	44,46 ± 2,3 ^{b}

*LD= Limite de detecção; LQ=Limite de quantificação; TR=Tempo de retenção; λ=Comprimento de onda; nd=não detectado. Médias ± desvio padrão; médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Para cada composto fenólico em cada extrato foram determinados os limites de detecção (LD), e quantificação (LQ). Assim como nas análises de compostos

fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método DPPH, as análises cromatográficas foram realizadas para as 8 condições de extração, seguindo-se o planejamento experimental 2^3 variando-se o tipo de solvente, tempo e temperatura de extração.

Ácido gálico

No processo de extração do ácido gálico da casca, o melhor resultado foi obtido com o uso de água como solvente, à temperatura de 35 ºC e tempo de extração de 90 minutos (78,13 $\mu g g^{-1}$). O gráfico de Pareto apresentado na Figura 13 mostra que para o ácido gálico os fatores temperatura, solvente, tempo, bem como a interação entre solvente e tempo foram significativos para o teor de ácido gálico do extrato de casca de *C. lechleri.*

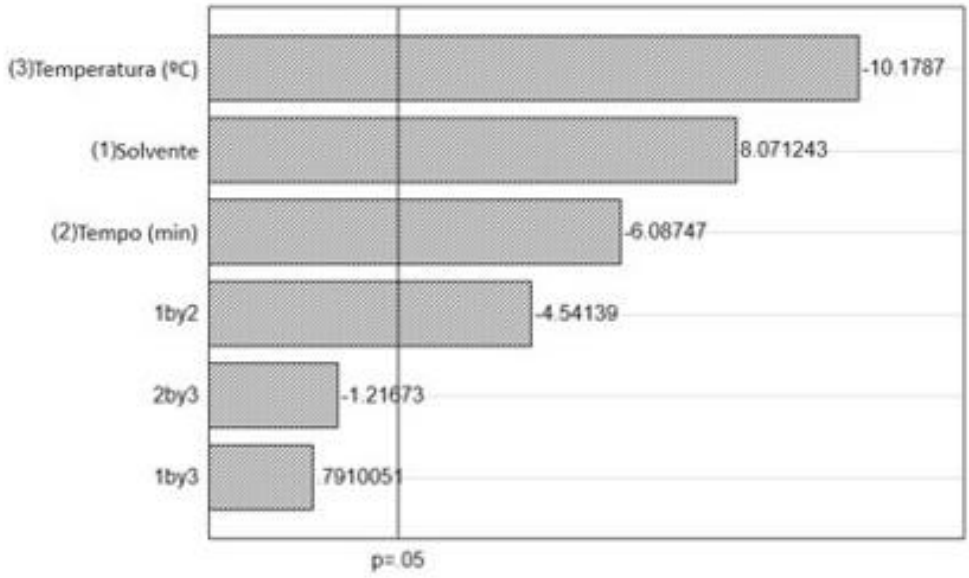

Figura 13 - Gráfico de Pareto para teor de ácido gálico dos extratos obtidos da casca de *C. lechleri*

O efeito do solvente foi positivo, indicando que uma mudança em seu valor no sentido positivo do solvente (água) acarretaria no aumento do teor de ácido gálico. Por outro lado, os efeitos de temperatura e tempo foram negativos, indicando que a

mudança de temperatura e tempo em seus menores níveis para níveis maiores resultaria em diminuição nos teores de ácido gálico. A interação solvente e tempo para a variável dependente ácido gálico também foi significativa ($p<0,05$), denotando que a extração de ácido gálico na casca de *C. lechleri* é favorecida pelo solvente água com menores tempos de extração.

O modelo gerado por regressão linear múltipla levando em consideração somente os efeitos significativos para a variável dependente ácido gálico resulta na Equação 5 e apresenta coeficiente de correlação de 0,962, indicando que o modelo matemático se ajusta bem aos dados experimentais.

$$AGcasca = 35.36 + 11.796x_1 - 8.89\,x_2 - 14.87\,x_3 - 6.64x_1x_2 \qquad (\mathrm{Eq.}\,5)$$

A partir desta modelagem, foram gerados os gráficos de superfície de resposta para a variável dependente ácido gálico em função dos fatores solvente, tempo e temperatura, apresentados na Figura 14. Foi possível observar que os maiores teores de ácido gálico foram obtidos quando se utilizou água como solvente, com 30 minutos de extração à temperatura de 35 ºC.

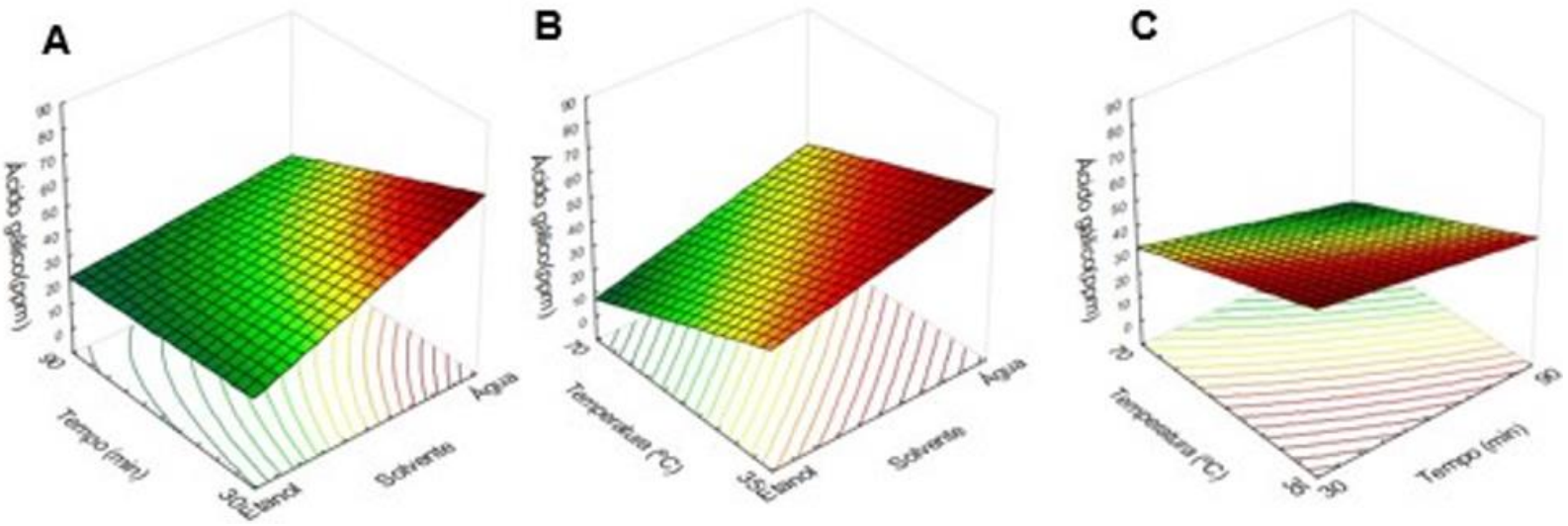

Figura 14 - Gráficos de superfície para teor de ácido gálico dos extratos obtidos da casca de *C. lechleri.* (A: solvente e tempo; B: solvente e temperatura; C: tempo e temperatura).

O teor de ácido gálico foi afetado por todos os fatores; solvente, tempo e temperatura, como mostra a Figura 14. Os gráficos de superfície de resposta confirmaram a modelagem multivariada, apresentando água como solvente extrator, tempo de extração de 30 minutos a temperatura de 35 ºC como melhor condição para a extração de ácido gálico em casca e *C. lechleri.*

O ácido gálico é um ácido fenólico constituído por um ácido benzoico de anel aromático com três substituintes hidroxila, conforme mostra a Figura 15. A presença de grupos OH aumenta a polaridade da molécula, que por sua vez terá preferência por solventes mais polares. Além disso, o impedimento estéreo que as nuvens eletrônicas estabelecem ao redor da molécula de ácido gálico impedem a interação da parte hidrofóbica (anel aromático) com a parte apolar da molécula de etanol, fazendo com que o ácido gálico tenha maior interação com a água.

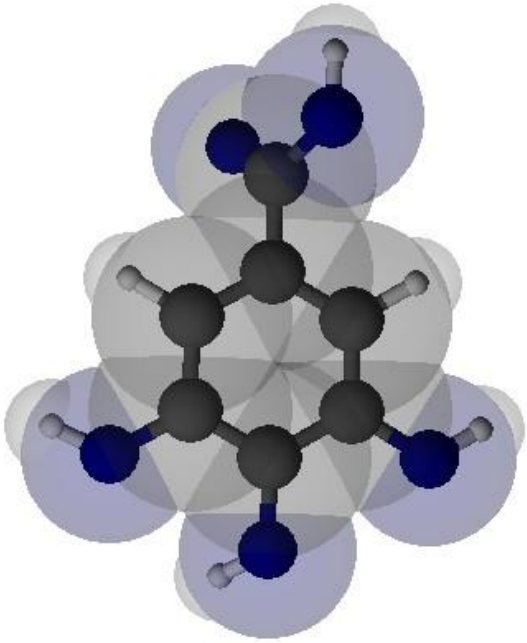

Figura 15 - Estrutura do ácido gálico.

Catequina

A catequina foi extraída da casca de *C. lechleri* em maiores concentrações com o emprego de etanol a 70 ºC e 90 minutos de extração, apresentando teores de 1241,83 $\mu g g^{-1}$ e diferindo significativamente ($p<0,05$)

das demais condições. A Figura 16 mostra o gráfico de Pareto para a variável dependente catequina. Os fatores temperatura e solvente, bem como a interação solvente e temperatura foram significativos no teor do composto quantificado.

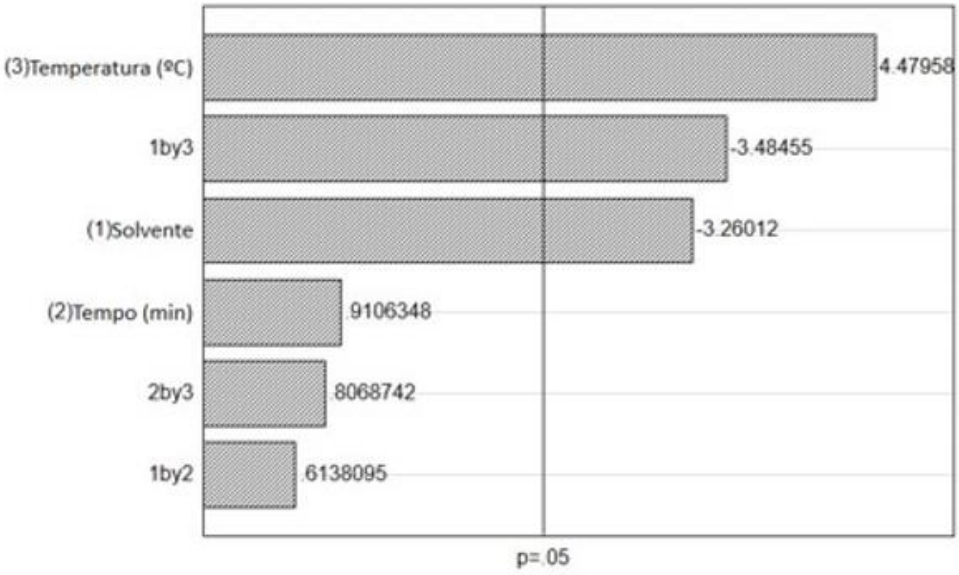

Figura 16 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para catequina por meio de CLAE em extratos de casca de *C. lechleri.*

O efeito positivo da temperatura indica que uma mudança em seu valor no sentido positivo acarretaria no aumento do teor de catequina, enquanto que o efeito negativo do solvente indica que a mudança de solvente em seus menores níveis para níveis maiores resultaria em diminuição nos teores de catequina obtida da casca de *C. lechleri.* Além disso, a interação solvente e temperatura para a variável dependente catequina também foi significativa (p<0,05), denotando que a extração da mesma é favorecida pelo solvente água e temperatura de 70 ºC.

A equação 6, obtida por regressão linear múltipla levando em consideração os fatores significativos obteve coeficiente de correlação de 0,832, indicando que o modelo matemático se ajusta bem aos dados experimentais.

$$CATcasca = 506.94 - 159.33x_1 + 218.93x_3 - 190.30x_1x_3 \qquad \text{(Eq. 6)}$$

A partir desta modelagem os gráficos de superfície de resposta apresentados na Figura 17 expõem a extração de catequina a partir da casca de *C. lechleri*. A catequina foi extraída em maior quantidade com o uso do solvente etanol com tempo de 90 minutos e temperatura de 70 ºC, de acordo com a condição G apresentada na Tabela 7.

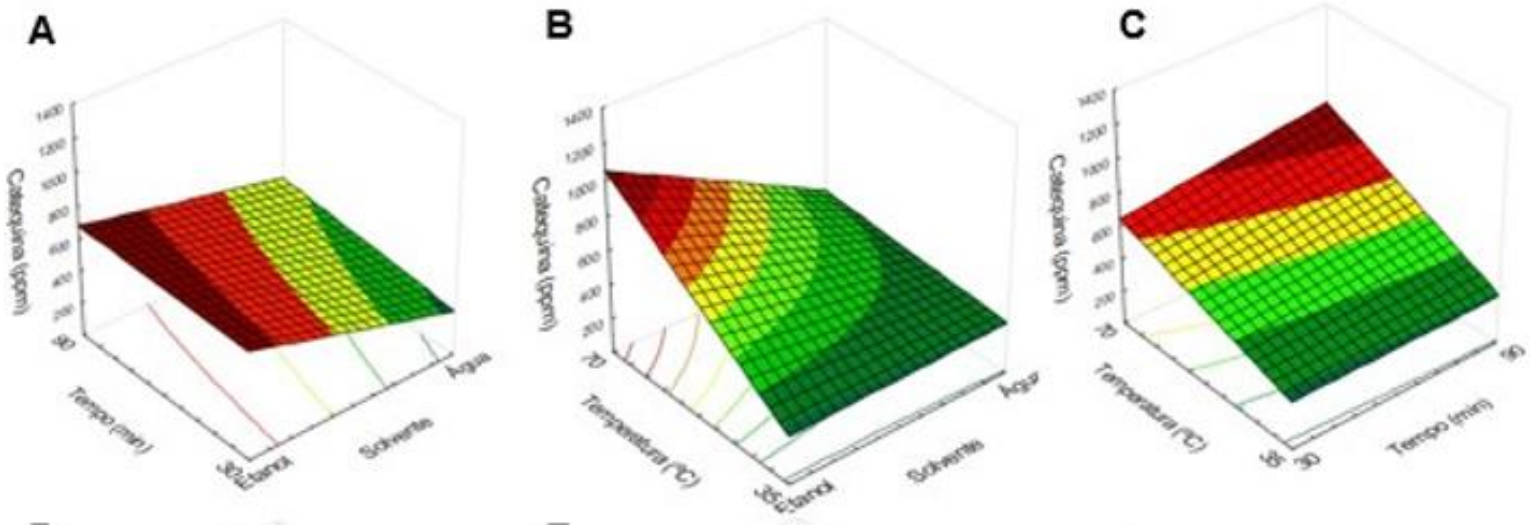

Figura 17 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de catequina (ppm) obtido por CLAE a partir dos extratos de casca de *C. lechleri.* (A: solvente e tempo; B: solvente e temperatura; C: tempo e temperatura).

O teor de catequina foi afetado pelos fatores temperatura e solvente, como mostra a Figura 16. Os gráficos de superfície de resposta confirmaram a modelagem multivariada, apresentando etanol como solvente extrator, tempo de 90 minutos e 70 ºC como melhor condição para a extração de catequina em casca e *C. lechleri.*

A catequina é um flavonoide da classe dos flavanóis e possui 5 OH como substituintes, conforme mostra a Figura 18. A extração de catequina a partir da casca é dificultada devida a presença de lignina, um composto fenólico que possui forte atração a açúcares, proteínas e derivados polimerizados, tornando difícil a extração de compostos de suas matrizes. Além disso, flavanóis são conhecidos como compostos de média polaridade devido as interações entre os anéis aromáticos e a parte hidrofóbica do solvente, o que explica sua melhor interação com o etanol.

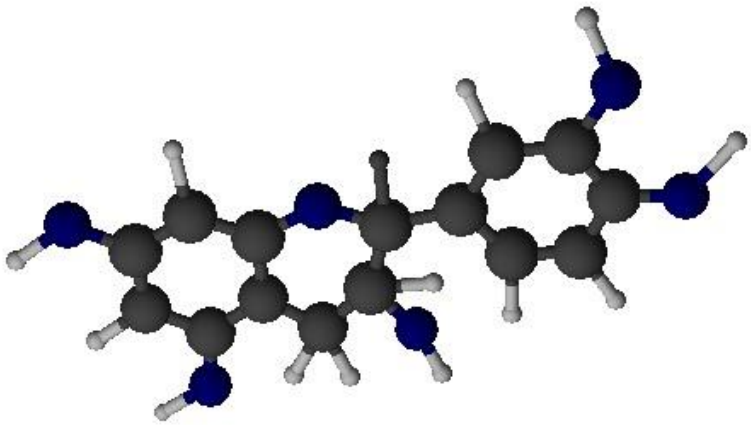

Figura 18 - Estrutura da catequina.

Epicatequina

O composto epicatequina foi quantificado no extrato de casca de *C. lechleri* em maiores concentrações (42,22 $\mu g g^{-1}$) na condição D, que corresponde ao uso de água como solvente, 90 minutos e 35 ºC de temperatura de extração. O gráfico de Pareto da Figura 19 mostra que todos os

fatores foram significativos no teor de epicatequina extraído. Os efeitos positivos dos fatores indicam que uma mudança em seus valores no sentido positivo do solvente, tempo e temperatura acarretariam no aumento do teor de epicatequina. As interações solvente e temperatura bem como solvente e tempo foram significativas na variável dependente epicatequina, sendo que a extração deste flavonoide é favorecida pelo solvente água, a temperatura de 35 ºC e 90 minutos de extração.

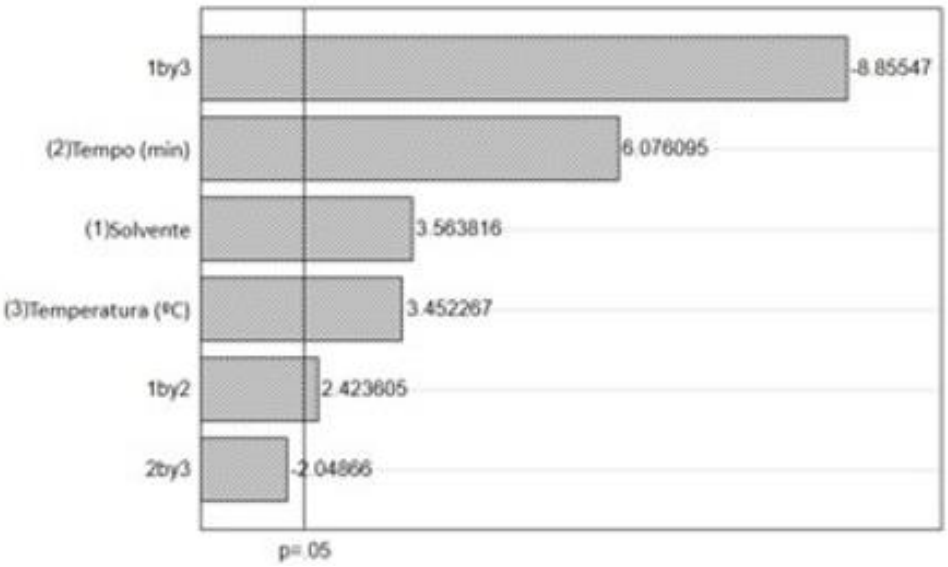

Figura 19 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração de epicatequina da casca de *C. lechleri* por meio de CLAE.

O modelo gerado por regressão linear múltipla levando em consideração somente os efeitos significativos para a variável dependente epicatequina resulta na Equação 7 e apresenta coeficiente de correlação de 0,943, indicando que os modelos matemáticos se ajustam bem aos dados experimentais.

$$EPIcasca = 28.00 + 2.29x_1 + 3.90x_2 + 2.22\,x_3 + 1.56\,x_1x_2 - 5.69\,x_1x_3 \quad \text{(Eq. 7)}$$

A partir desta modelagem, foram gerados os gráficos de superfície de resposta para a variável dependente epicatequina em função dos fatores solvente, tempo e temperatura, apresentados na Figura 20. Foi possível

observar que os maiores teores de epicatequina foram obtidos com o uso do solvente água, a temperatura de 35 ºC e 90 minutos de extração.

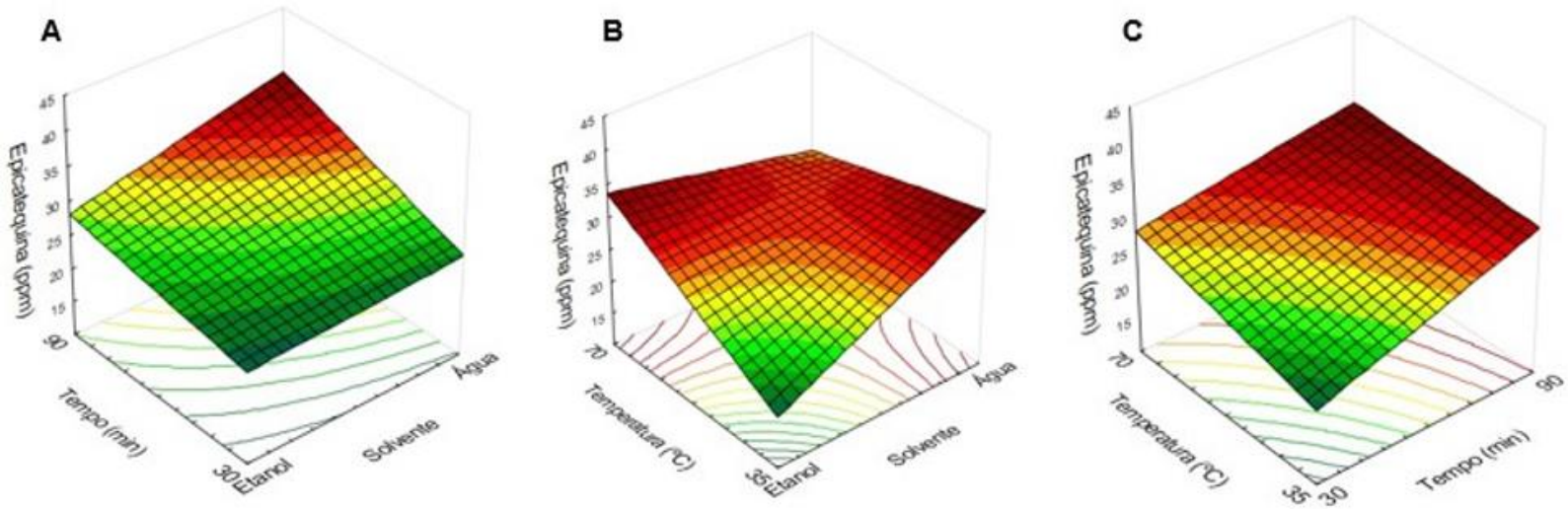

Figura 20 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de epicatequina obtido por CLAE a partir dos extratos de casca de *C. lechleri.* (A: solvente e tempo; B: solvente e temperatura; C: tempo e temperatura).

O teor de epicatequina foi afetado por todos os fatores; solvente, tempo e temperatura, como mostra a Figura 20. Os gráficos de superfície de resposta confirmaram a modelagem multivariada, apresentando água como solvente extrator, tempo de extração de 90 minutos a temperatura de 35 ºC como melhor condição para a extração de epicatequina em casca e *C. lechleri.*

A epicatequina é um isômero da catequina que se diferencia pelo plano da hidroxila do C3, conforme mostra a Figura 21. A extração da epicatequina a partir da casca pode ter sido dificultada devida a presença da lignina, composto fenólico complexo formado pelos álcoois conferil, cumaril e sinapil, viabilizando a formação de ligações de hidrogênio entre as OH presente na lignina e no flavonoide.

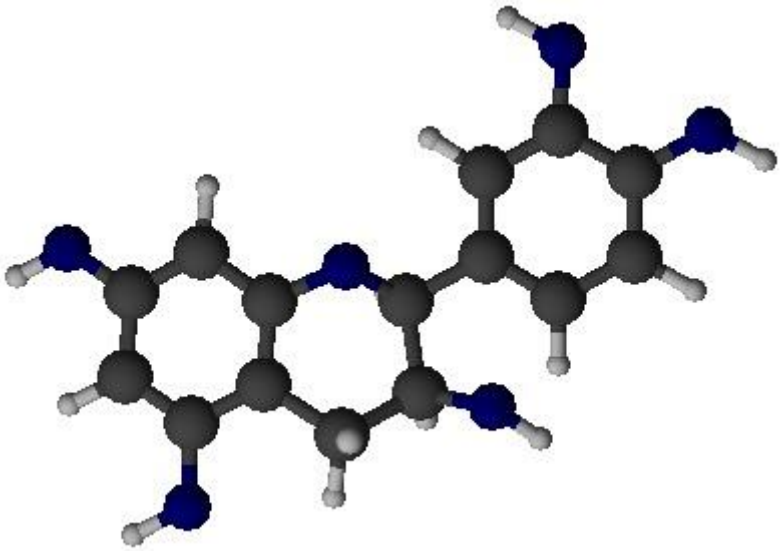

Figura 21 - Estrutura da epicatequina.

Ácido siríngico

O ácido siríngico foi extraído em maiores teores (55,02 $\mu g g^{-1}$) com o uso do solvente água, temperatura de 35 ºC e 90 minutos de extração, conforme as condições D para extração de ácido siríngico da casca de *C. lechleri*. Analisando o gráfico de Pareto apresentado na Figura 22, foi possível observar que todos os fatores e todas as interações foram significativos na extração de ácido siríngico da casca de *C. lechleri*.

Os efeitos positivos do solvente e tempo indicam que uma mudança em seu valor no sentido positivo do solvente (água) e tempo (90 minutos) acarretaria no aumento do teor de ácido siríngico. Por outro lado, o efeito da temperatura foi negativo, indicando que a mudança de temperatura em seu menor nível para níveis maiores resultaria em diminuição nos teores de ácido siríngico.

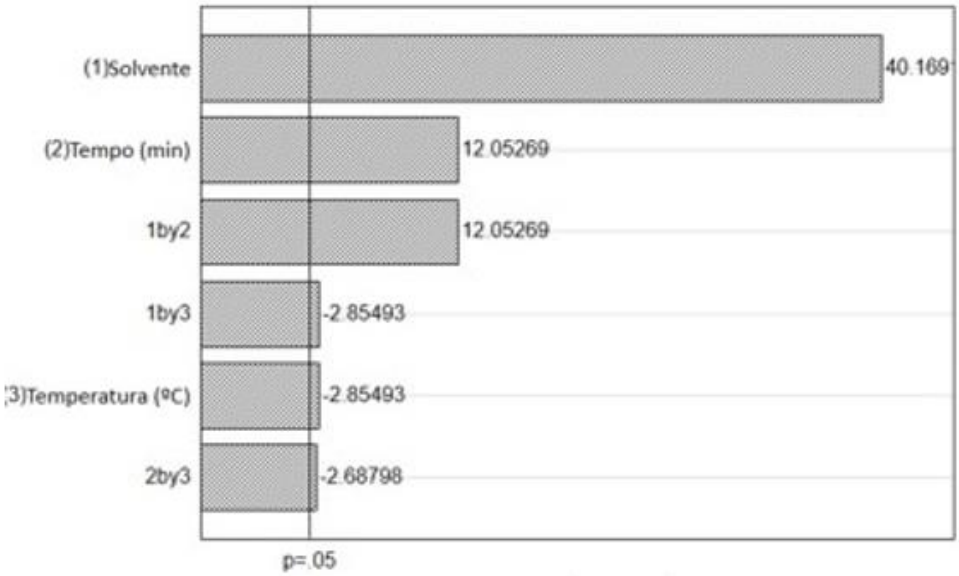

Figura 22 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração de ácido siríngico da casca de *C. lechleri* por meio de CLAE.

Ainda de acordo com o gráfico de Pareto da Figura 22, pode-se observa que as três interações foram significativas, denotando que a extração de ácido siríngico a partir da casca de *C. lechleri* é favorecida pelo solvente água, tempo de extração de 90 minutos a temperatura de 35 ºC.

O modelo gerado por regressão linear múltipla levando em consideração somente os efeitos significativos para a variável dependente ácido siríngico resulta na Equação 8, e apresenta coeficiente de correlação de 0,995, indicando que os modelos matemáticos se ajustam bem aos dados experimentais.

$$AS_{casca} = 19.13 + 19.13\,x_1 + 5.74\,x_2 - 1.36\,x_3 + 5.74\,x_1x_2 - 1.34x_1x_3 - 1.28\,x_2x_3 \quad (\mathrm{Eq.}\,8)$$

A partir deste modelo, foram gerados os gráficos de superfície de resposta para a variável dependente ácido siríngico em função dos fatores solvente, tempo e temperatura, apresentados na Figura 20. O teor de ácido siríngico obtido a partir da casca de *C. lechleri* foi resultante de todos os fatores; solvente, tempo e temperatura, como mostra a Figura 24. Os gráficos de superfície de resposta confirmaram a modelagem multivariada, apresentando água como solvente extrator, tempo de extração de 90 minutos a temperatura de 35 ºC como melhor condição para a extração de ácido siríngico em casca e *C. lechleri.*

O ácido siríngico é um ácido fenólico constituído de um ácido benzoico, um grupo OH e dois grupos éter metílico, conforme mostra a Figura 23. A presença dos grupos éter metílico e hidroxila conferem a molécula de ácido siríngico maior polaridade, aumento sua interação com o solvente água quando comparado ao etanol, sendo portanto seu melhor rendimento explicado por este fato.

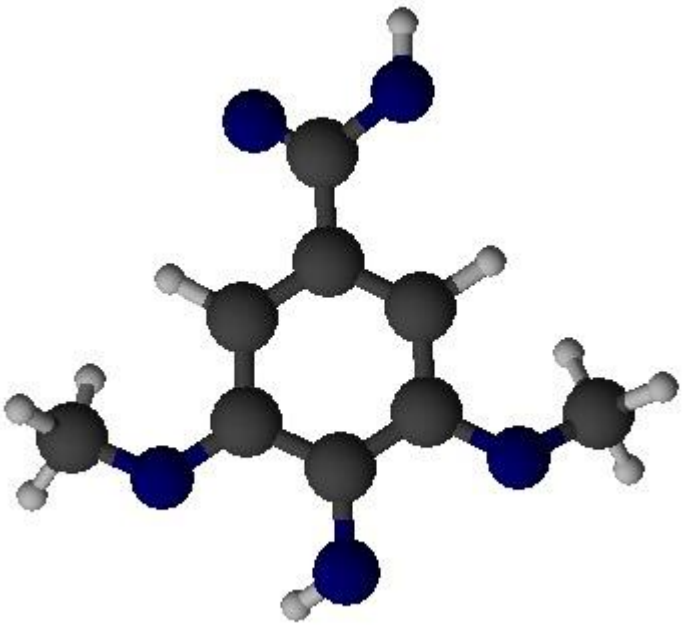

Figura 23 - Estrutura do ácido siríngico.

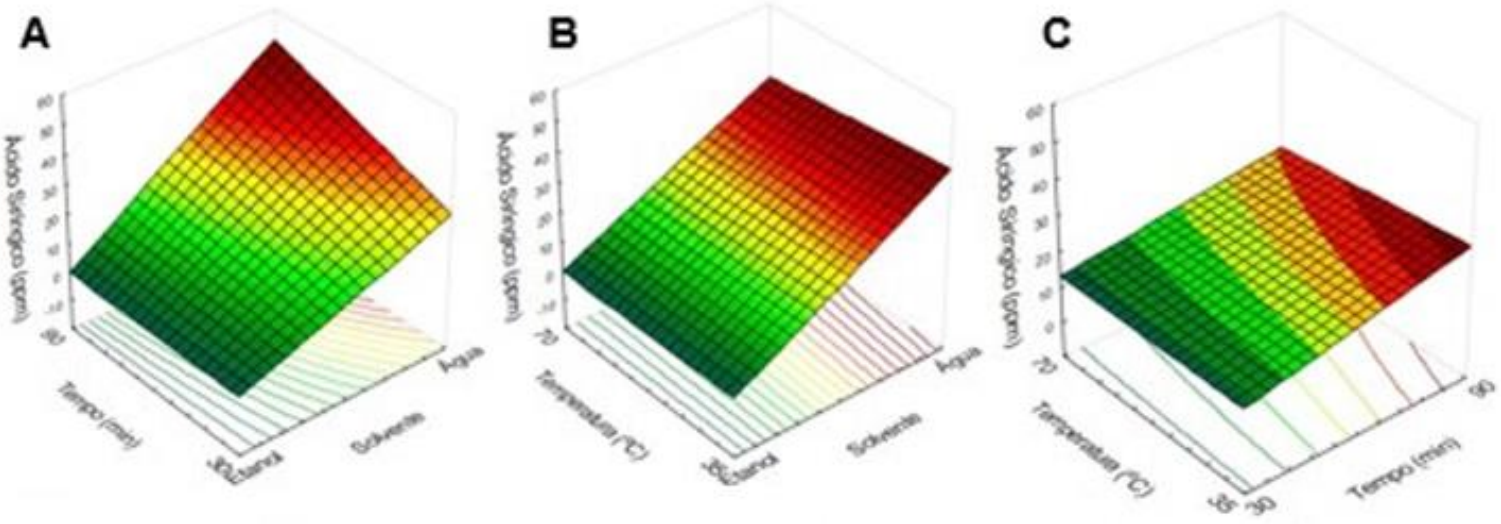

Figura 24 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de ácido siríngico obtido por CLAE a partir dos extratos de casca de *C. lechleri.* (A: solvente e tempo; B: solvente e temperatura; C: tempo e temperatura).

Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais (PCA) é uma técnica largamente utilizada para processar um grande número de dados e facilitar sua interpretação, fornecendo um mapa onde as variáveis observadas são projetadas na forma de vetores que vão da origem até o ponto onde encontram seus grupos de similaridades (Becerra-Herrera *et al.*, 2018; Novaes *et al.*, 2017). A Figura 25 mostra a PCA para os dados obtidos através na análise cromatográfica dos extratos de casca de *C. lechleri.*

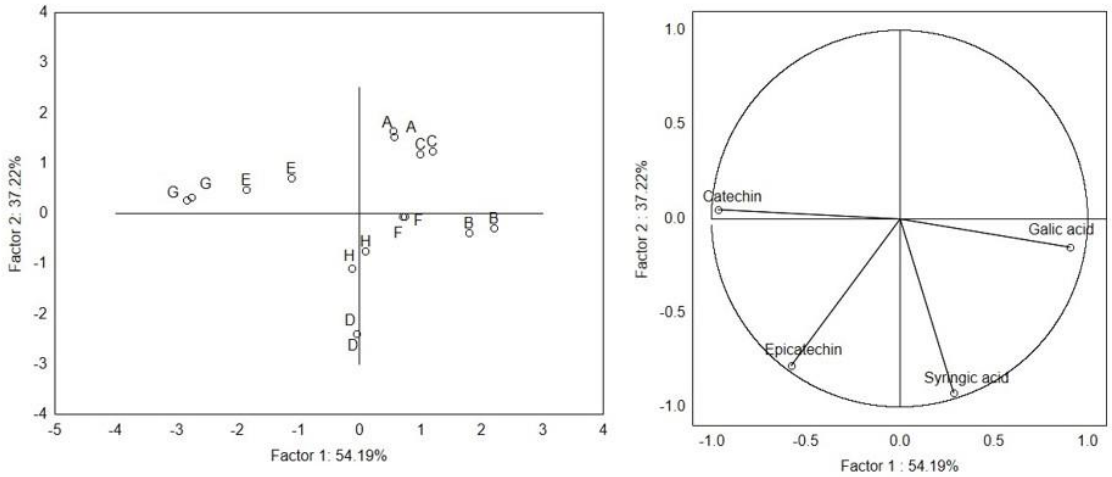

Figura 25 – Análise de componentes principais (PCA) para os dados obtidos através na análise cromatográfica dos extratos de casca de *C. lechleri.* Distribuição das condições de extração no gráfico de escores (esquerda) e distribuição dos compostos isolados no gráfico de pesos (direita).

Como pode ser observado na Figura 25, a primeira componente principal (PC1) e a segunda (PC2) foram capazes de descrever 54,19 e 37,22% da variância dos dados, respectivamente, somando 92,59 da variância total. O grupo formado pelos ensaios A e C localizados no primeiro quadrante apresentaram os menores rendimento para os compostos isolados por CLAE, mostrando que o uso de etanol a 35 ºC foi o menos eficiente para a extração dos compostos fenólicos. O segundo grupo foi composto pelas condições E e

G (etanol, 70 ºC) e obteve os melhores valores para catequina, mostrando que este composto foi mais estável que os demais em altas temperaturas. O composto epicatequina, melhor extraído nas condições D e H (água, 90 minutos) precisou de mais tempo para ser extraída, conforme sua posição no terceiro quadrante. Os ácidos gálico e siríngico, por outro lado, foram melhores extraídos da casca de *C. lechleri* nas condições B e F (água, 30 minutos).

(Sisodia; SiddiquI, 2010) encontraram valores de CFT de 49,73 mg EAG g^{-1} para o extrato aquoso do caule de *Croton bonplandianum* coletado em Aligarh, Índia. As amostras de casca de *C. lechleri* tiveram compostos fenólicos melhores extraídos utilizando-se etanol como solvente extrator tempo de 90 minutos a 70 ºC e apresentando diferenças significativas ($p<0,05$) quanto ao tempo de extração. A atividade antioxidante da casca foi empregando-se etanol, não havendo diferença significativa ($p<0,05$) com a mudança no tempo de extração.

Cordeiro *et al.* (2016) utilizaram Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) na identificação dos compostos fenólicos catequina, epicatequina, gallocatequina e alcaloides no extrato metanólico da casca de *Croton urucurana.* Nascimento *et al.* (2017), utilizou a fração de acetato etílico do extrato de folhas de *C. cajucara* e isolou Catequina e Epicatequina.

5.2 RESULTADOS OBTIDOS COM O USO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *C. LECHLERI*

5.2.1 Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante nas folhas de *C. lechleri*

O teor de compostos fenólicos totais nos extratos de folhas de *C. lechleri* variou de 04,60 a 15,36 EAG g^{-1} e sua atividade antioxidante de 31,19 a 46,67 µmol de Trolox g^{-1}, conforme mostra a Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados obtidos referente ao delineamento fatorial para CFT (mg EAG.g^{-1}) e AA (µmol de Trolox. g^{-1}) em extratos da folha de *C. lechleri.*

Ensaios	Variáveis			Folha	
	X1	X2 (min.)	X3 (°C)	TCF (mg EAG/g)	AA (µmol Trolox/g)
A	Etanol	30	35	04,60 ± 0,14 ^{e}	31,19 ± 0,14 ^{f}
B	Água	30	35	13,08 ± 0,02 ^{b}	35,53 ± 0,31 ^{cd}
C	Etanol	90	35	06,72 ± 0,20 ^{d}	36,55 ± 0,16 ^{c}
D	Água	90	35	13,05 ± 0,61 ^{b}	33,42 ± 0,52 ^{e}
E	Etanol	30	70	09,71 ± 0,08 ^{c}	46,19 ± 0,07 ^{a}
F	Água	30	70	15,13 ± 0,31^{a}	40,46 ± 0,32 ^{b}
G	Etanol	90	70	10,62 ± 0,58 ^{c}	46,67 ± 0,11 ^{a}
H	Água	90	70	15,36 ± 0,52 ^{a}	34,33 ± 1,15 ^{de}

Médias ± desvio padrão; médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). CFT: Compostos fenólicos totais; AA: Atividade antioxidante; EAG: Equivalente em ácido gálico.

A Tabela 7 mostra os resultados obtidos da análise de variância (ANOVA) para os extratos de folhas de *C. lechleri.*

Tabela 7 Resultados de ANOVA para as variáveis CFT e AA das folhas de *C. lechleri*

Fatores	Compostos fenólicos				
	Soma dos Quadrados	**GL**	**Média dos Quadrados**	**F-calculado**	**p-valor**
Solvente (X1)	233.91	1	233.91	1290.23	**0.0000**
Tempo (X2)	3.91	1	3.91	21.55	**0.0002**
Temperatura (X3)	67.01	1	67.01	369.61	**0.0000**
X1;X2	3.01	1	3.01	16.62	**0.0008**
X1;X3	8.06	1	8.06	44.45	**0.0000**
X2;X3	0.35	1	0.35	1.90	0.1856
Resíduo	3.08	17			
Total	319.32	23			
Fatores	**Atividade Antioxidante**				
	Soma dos Quadrados	**GL**	**Média dos Quadrados**	**F-calculado**	**p-valor**
Solvente (X1)	53.9912	1	53.9912	5.37815	**0.033100**
Tempo (X2)	202.2573	1	202.2573	20.14719	**0.000324**
Temperatura (X3)	99.1626	1	99.1626	9.87775	**0.005933**
X1;X2	116.1560	1	116.1560	11.57050	**0.003396**
X1;X3	84.4696	1	84.4696	8.41415	**0.009947**
X2;X3	109.0502	1	109.0502	10.86268	**0.004268**
Resíduo	170.6627	17	10.0390		
Total	835.7496	23			

GL=Graus de liberdade; Resultados em negrito referem-se a diferenças significativos (p<0,05).

Os maiores teores de compostos fenólicos nas folhas de *C. lechleri*, foram encontrados quando o solvente extrator foi água, enquanto o tempo de extração não apresentou diferença significativa (p<0,05) entre 30 e 90 minutos. A atividade antioxidante foi maior nos extratos obtidos com etanol, não havendo diferença significativa (p<0,05) com a mudança no tempo de extração.

Pela ANOVA, para a extração de compostos bioativos em folhas, os três fatores analisados (solvente, tempo e temperatura de extração) foram

significativos para as variáveis dependentes compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.

A interação solvente e tempo de extração foram significativos para o teor de CFT para casca e folha e AA para casca, folha e resíduo de seiva, enquanto que a interação solvente e temperatura foi significativa para todas as variáveis dependentes. A interação tempo e temperatura de extração por sua vez, mostrou-se significativa para atividade antioxidante dos extratos para casca, folhas e resíduos de *C. lechleri,* enquanto que para o teor de compostos fenólicos e antocianinas estas interações não foram significativas.

Em folhas de *C. lechleri* a maior diferença foi encontrada para o fator solvente para variável dependente fenólicos totais (290 vezes maior que o $F_{tabelado}$) enquanto que para a atividade antioxidante o efeito da temperatura apresentou maior significância (345 vezes maior que o $F_{tabelado}$).

Os gráficos de Pareto na Figura 26 mostram que na avaliação do CFT e AA dos extratos obtidos das folhas de *C. lechleri*, os resultados dos fatores solvente, temperatura suas interações foram os mais expressivos, embora não na mesma ordem. Enquanto o solvente tem efeito positivo no teor de compostos fenólicos totais, o mesmo fator apresenta efeito negativo na atividade antioxidante.

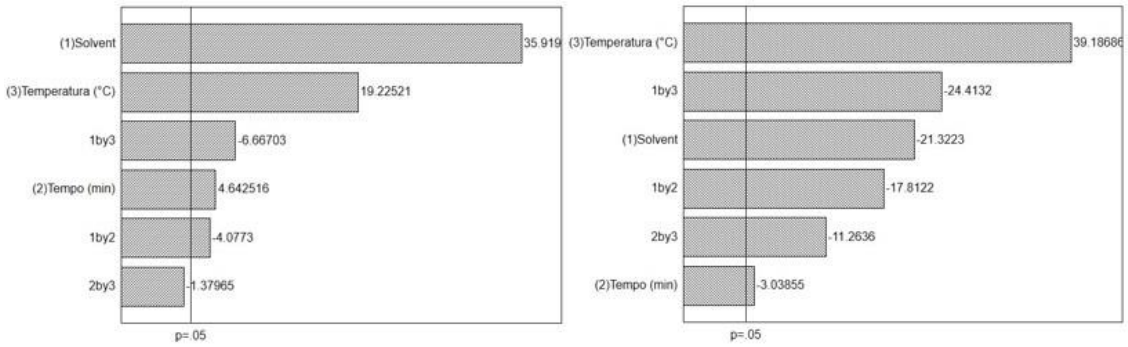

Figura 26 - Gráficos de Pareto para CFT (esquerda) e AA (direita) dos extratos de folha de *C. lechleri.*

A resposta AA apresentou efeitos positivos e significativos para o fator temperatura de extração. Além disso, somente a interação tempo e

temperatura de extração não foi significativa (p<0,05) para aa extração de compostos fenólicos.

Os resultados obtidos regressão linear múltipla deram origem aos modelos ajustados levando em consideração somente os efeitos significativos para as variáveis dependentes fenólicos totais e atividade antioxidante para folhas de *C. lechleri*, conforme mostra a Tabela 8.

Tabela 8 - Modelos gerados por regressão linear múltipla para as variáveis dependentes, compostos fenólicos, atividade antioxidante em função dos fatores; tipo de solvente, tempo e temperatura.

Equação	**Modelo Gerado**	**Coeficiente de Correlação (R^2)**
9	$CFT\ folhas = 11.03 + 3.12x_1 + 0.40x_2 + 1.67x_3 - 0.35x_1x_2 - 0.58x_1x_3$	0.992
10	$AA\ folhas = 38.04 - 2.11x_1 - 0.30x_2 + 3.87x_3 - 1.76x_1x_2 - 2.41x_1x_3 - 1.11x_2x_3$	0.994

Respostas: CFT: compostos fenólicos totais; AA: atividade antioxidante

Os valores de coeficiente de correlação acima de 0,9 indicam que os modelos utilizados se ajustam aos dados experimentais. A Figura 27 mostra as superfícies de resposta obtidas para compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos obtidos da folha de *C. lechleri.*

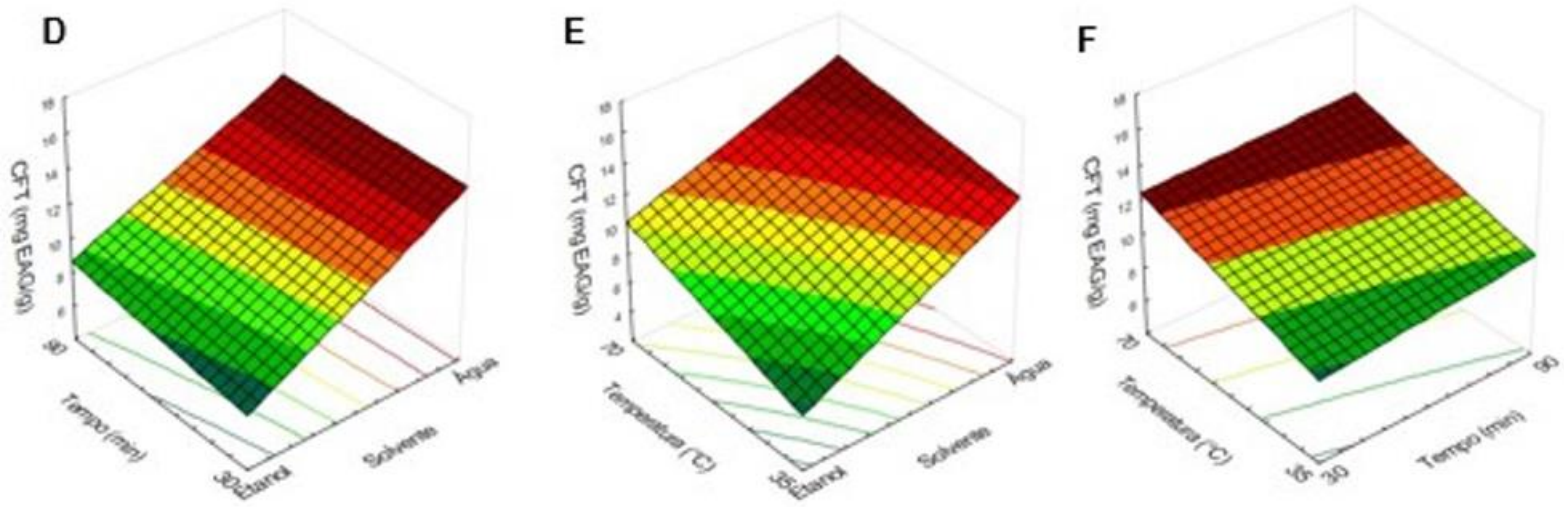

Figura 27 - Gráficos de superfície para compostos fenólicos totais dos extratos obtidos da folha de C. lechleri. (D: solvente e tempo; E: solvente e temperatura; F: tempo e temperatura).

Os extratos de folhas apresentaram teores de CFT mais baixos que os verificados para as cascas. Na variável dependente CFT para a folha, a água e 70 ºC foram determinantes quando analisados os fatores solvente e temperatura A água também foi importante quando observados os fatores solvente e tempo enquanto o tempo não apresentou diferença expressiva entre 30 e 90 minutos de extração. A temperatura de 70 ºC também se mostrou determinante quando verificados os fatores tempo e temperatura, enquanto que o tempo não apresentou diferença entre 30 e 90 minutos.

A Figura 28 apresenta os gráficos de superfície de resposta para a variável dependente atividade antioxidante (AA) dos extratos obtidos da folha (D, E, F) de *C. lechleri* obtida pelo método de sequestro do radical DPPH equivalente em Trolox.

Para as AA das folhas, o etanol apresentou melhores valores e quando relacionado com a temperatura de 70 ºC, e tempo, onde o tempo de 90 minutos proporcionou maior AA. Porém, quando relacionado com a temperatura, o tempo não foi expressivamente determinante na AA do extrato, enquanto a temperatura de 70 ºC foi de maior relevância.

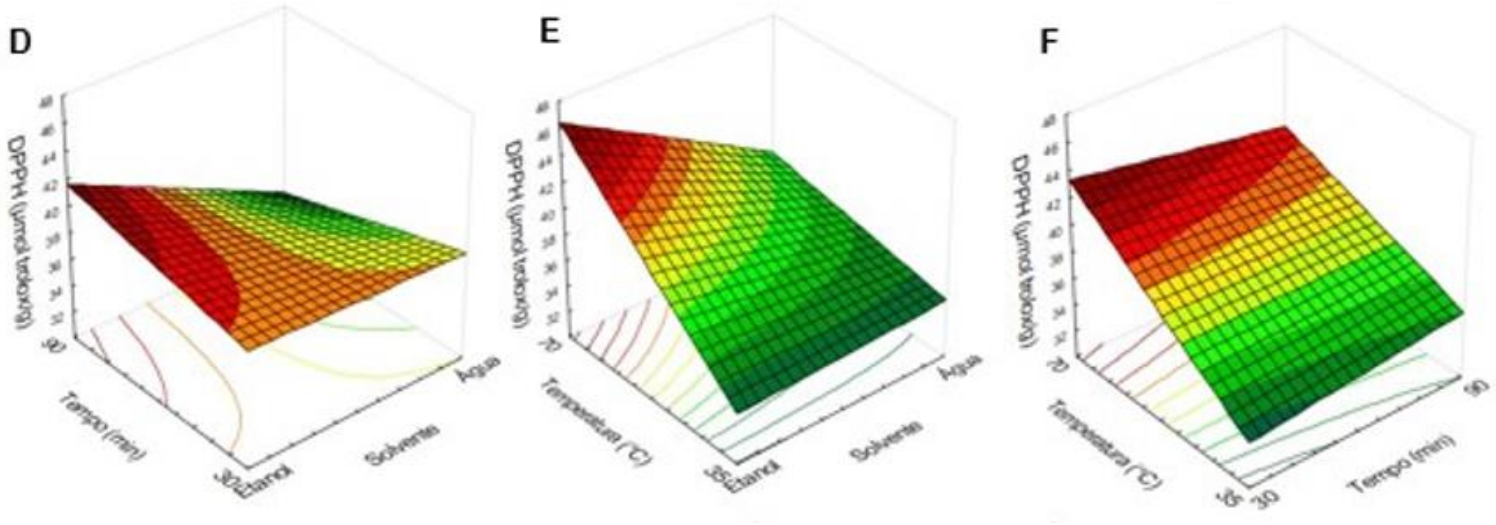

Figura 28 - Gráficos de superfície para atividade antioxidante dos extratos obtidos das folhas *de C. lechleri*. (D: solvente e tempo; E: solvente e temperatura; F: tempo e temperatura).

5.2.2 Determinação de compostos fenólicos da folha de *C. lechleri* por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Nos extratos obtidos com a folha de *C. lechleri* foram identificados os seguintes compostos fenólicos: ácido gálico, ácido siríngico, catequina e epicatequina. Para cada composto fenólico em cada extrato foram determinados os limites de detecção (LD), e quantificação (LQ). A Tabela 9 mostra os compostos fenólicos identificados por CLAE obtidos o extrato da folha, nas condições de extração.

Tabela 9 – Perfil dos compostos fenólicos quantificados por CLAE nos extratos de folha de *C. lechleri.*

	Ácido gálico (μgg^{-1})	**Catequina (μgg^{-1})**	**Epicatequina (μgg^{-1})**	**Ácido siríngico (μgg^{-1})**	**Ácido Cumárico (μgg^{-1})**	**Ácido ferrúlico (μgg^{-1})**
LD (μgg^{-1})	1,386641	1,977346	3,705455	1,128451	1,49939	1,284458
LQ (μgg^{-1})	4,622135	6,591153	12,35152	3,761505	4,997968	4,281526
TR (min.)	3,24 ± 0,28	8,51± 0,89	13,73 ± 0,77	13,06 ± 0,14	17,37 ± 0,18	21,54 ± 0,23
λ (nm)	272	260 e 290	276	274	309	319
A	28,24 ± 0,58 ^{b}	76,83 ± 1,54 ^{e}	nd	nd	nd	21,35 ± 0,23 ^{d}
B	65,29 ± 2,66 ^{a}	503,44 ± 2,82 ^{a}	nd	45,76 ± 1,09 ^{b}	177,34 ± 14,02 ^{a}	108,89 ± 11,87 ^{a}
C	28,24 ± 2,55 ^{b}	36,39 ± 1,40 ^{e}	16,50 ± 0,53 ^{b}	nd	25,15 ± 0,95 ^{c}	24,25 ± 1,19 ^{d}
D	69,83 ± 1,65 ^{a}	284,60 ± 4,62 ^{b}	14,93 ± 0,51 ^{b}	73,97 ± 1,20 ^{a}	167,63 ± 5,17 ^{a}	48,59 ± 4,05 ^{bc}
E	31,59 ± 0,82 ^{b}	86,58 ± 1,00 ^{de}	18,86 ± 0,92 ^{ab}	nd	27,5 ± 0,35 ^{c}	30,88 ± 3,37 ^{cd}
F	69,42 ± 1,40 ^{a}	312,60 ± 1,15 ^{b}	21,04 ± 0,49 ^{a}	59,03 ± 0,57 ^{b}	169,46 ± 3,44 ^{a}	57,29 ± 0,18 ^{b}
G	31,58 ± 0,12 ^{b}	141,98 ± 1,80 ^{cd}	18,89 ± 0,72 ^{ab}	nd	28,51 ± 1,29 ^{c}	30,03 ± 2,20 ^{cd}
H	35,62 ± 1,43 ^{b}	152,98 ± 0,12 ^{c}	19,10 ± 2,32 ^{ab}	57,28 ± 3,09 ^{b}	100,44 ± 2,93 ^{b}	38,84 ± 8,49 ^{bcd}

*LD= Limite de detecção; LQ=Limite de quantificação; TR=Tempo de retenção; λ=Comprimento de onda. Médias ± desvio padrão; médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Ácido gálico

No processo de extração do ácido gálico da folha de *C. lechleri*, os melhores resultados foram obtidos com o uso de água como solvente, a temperaturas de 35 ºC por 30 minutos (65,29 $\mu g g^{-1}$), 90 minutos e 35 ºC (69,83 $\mu g g^{-1}$) e 30 minutos a 70 ºC (69,42 $\mu g g^{-1}$). O gráfico de Pareto apresentado na Figura 29 mostra que apenas o fator solvente foi significativo e teve efeito positivo no teor de ácido gálico, indicando que uma mudança em seu valor no sentido positivo do solvente (água) acarretaria no aumento do teor de ácido gálico.

As interações tempo e temperatura e solvente e temperatura foram significativas no teor de ácido gálico obtido da folha de *C. lechleri,* mostrando que a quantidade de ácido gálico extraída da amostra é favorecida pelo solvente água.

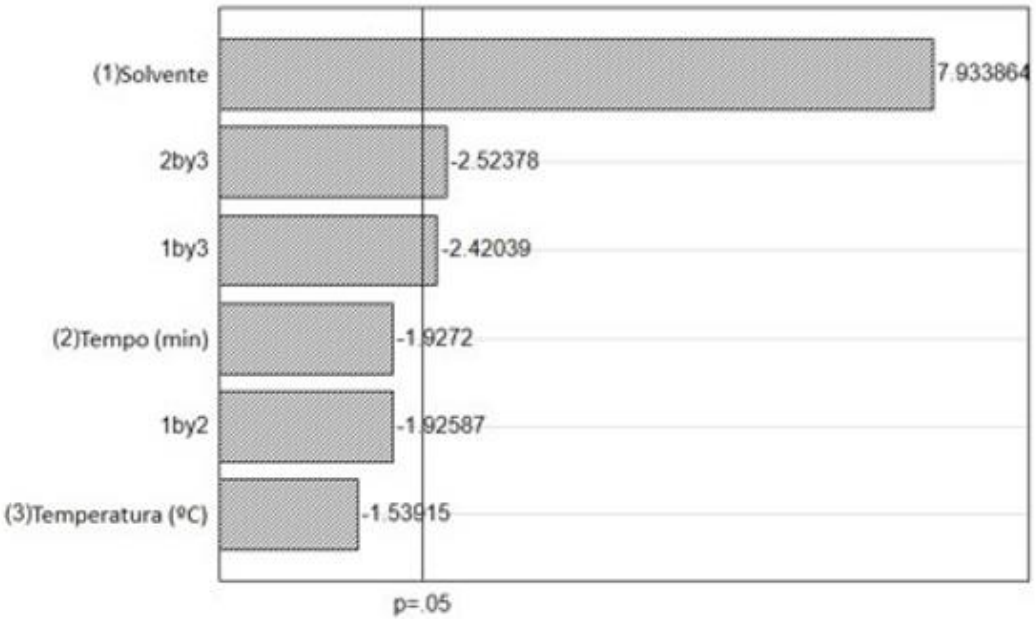

Figura 29 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para o ácido gálico por meio de CLAE em extratos da folha de *C. lechleri.*

O modelo gerado por regressão linear múltipla levando em consideração somente os efeitos significativos para a variável dependente ácido gálico da

folha de *C. lechleri* obtiveram valores de coeficiente de correlação de 0,904, apresentados Equação 11, indicando que o modelo matemático se ajusta bem aos dados experimentais.

$$AGfolhas = 44.98 + 15.06x_1 - 4.59x_1x_3 - 4.79x_2x_3 \qquad (Eq.11)$$

A partir dessa modelagem matemática são obtidos os gráficos de superfície de resposta apresentados na Figura 30, onde é possível observar que os maiores teores de ácido gálico foram obtidos quando se utilizou água como solvente extrator e que a interação tempo e temperatura foi determinante no teor do composto extraído, confirmando a modelagem multivariada dos dados.

Assim, como ocorreu na extração do ácido gálico a partir de casca de *C. lechleri*, a extração do composto a partir das folhas da planta também foi favorecido com o uso de água. Este fato pode ser atribuído a alta polaridade que os substituintes OH conferem ao composto, favorecendo sua extração a partir do uso de água, solvente mais polar.

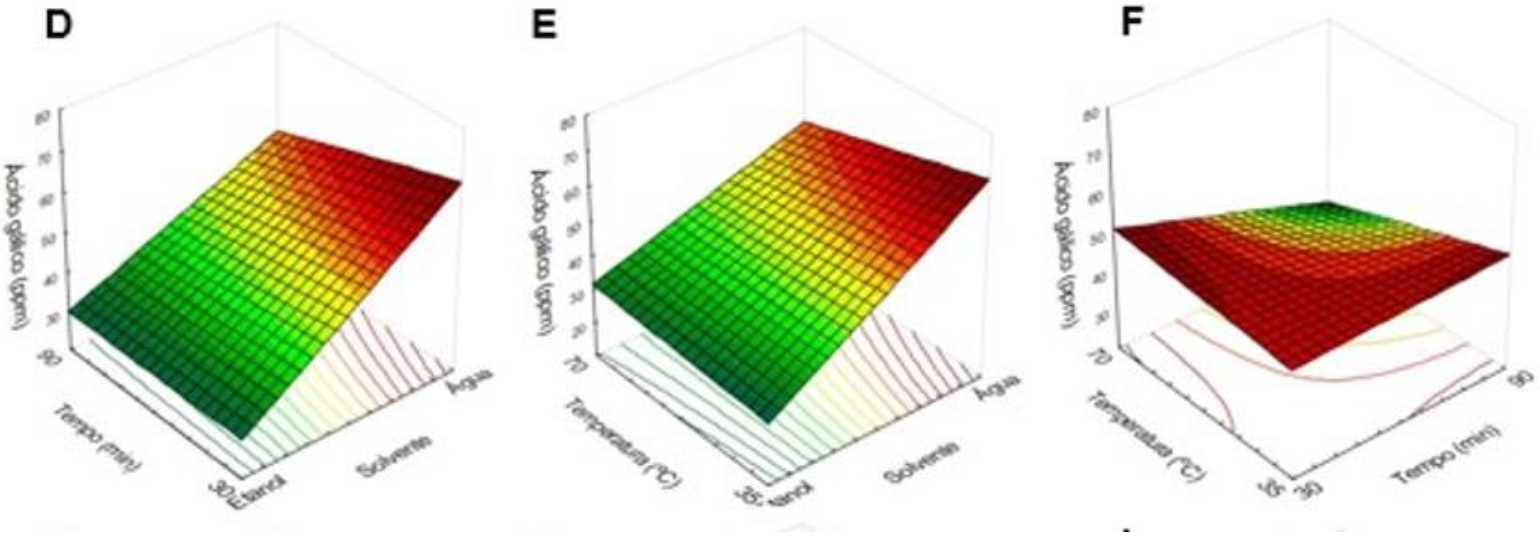

Figura 30 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de ácido gálico obtido por CLAE a partir dos extratos de folhas de *C. lechleri.* (D: solvente e tempo; E: solvente e temperatura; F: tempo e temperatura).

Catequina

O maior teor de catequina extraído da folha de *C. lechleri* (503,44 $\mu g g^{-1}$) foi obtido com o uso de água, temperatura de 35 ºC a 30 minutos de extração. A Figura 31 mostra o gráfico de Pareto para a quantificação de catequina nos extratos de folha de *C. lechleri,* onde foi possível observar que todos os fatores e todas a interações foram significativas no teor de catequina extraída. O efeito positivo do solvente inca que que uma mudança em seu valor no sentido positivo do solvente acarretaria no aumento do teor de catequina. Por outro lado, os efeitos de temperatura e tempo foram negativos, indicando que a mudança de temperatura e tempo em seus menores níveis para níveis maiores resultaria em diminuição nos teores de composto.

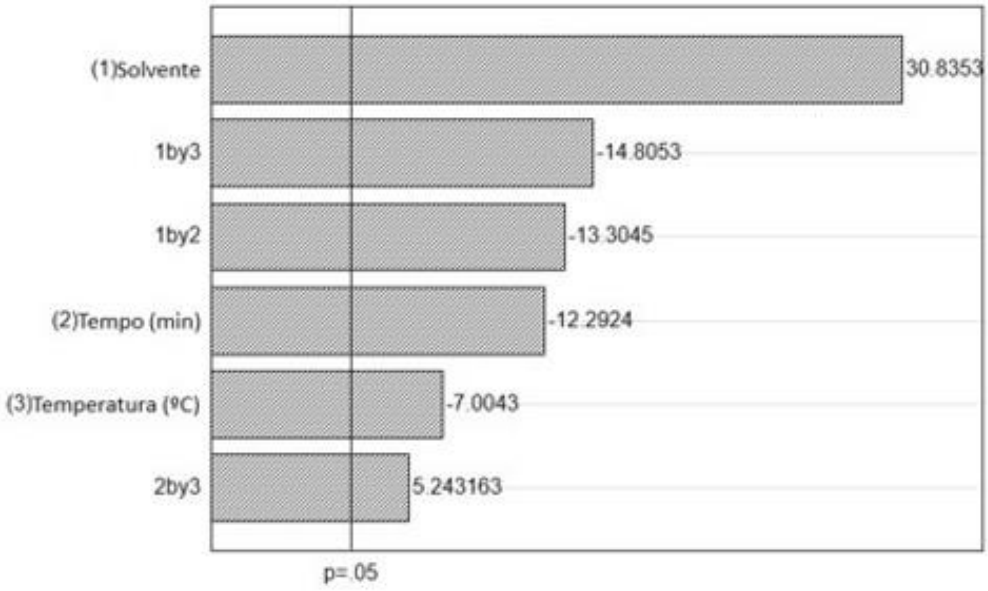

Figura 31 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para catequina por meio de CLAE em extratos de folha de *C. lechleri.*

A equação 12, apresenta o modelo gerado por regressão linear múltipla levando em consideração os fatores significativos, que obteve coeficiente de correlação de 0,994, indicando que o modelo matemático se ajusta bem aos dados experimentais.

$$CATfolhas = 199.43 + 113.98x_1 - 45.44x_2 - 25.89x_3 - 49.18x_1x_2 - 54.73x_1x_3 + 19.38x_2x_3 \quad (Eq. 12)$$

Os gráficos de superfície de resposta gerados a partir da modelagem matemática são apresentados na Figura 32. Para a extração de catequina a partir da folha da planta, a água, à temperatura de 35 ºC e tempo de extração de 90 minutos são recomendados, confirmando a modelagem multivariada dos dados.

A catequina foi melhor extraída da folha de *C. lechleri* com o uso de água como solvente. Esta característica pode ser atribuída ao impedimento estéreo que as nuvens eletrônicas dos oxigênios das hidroxilas causam à parte apolar da molécula, dando a esta característica mais polar.

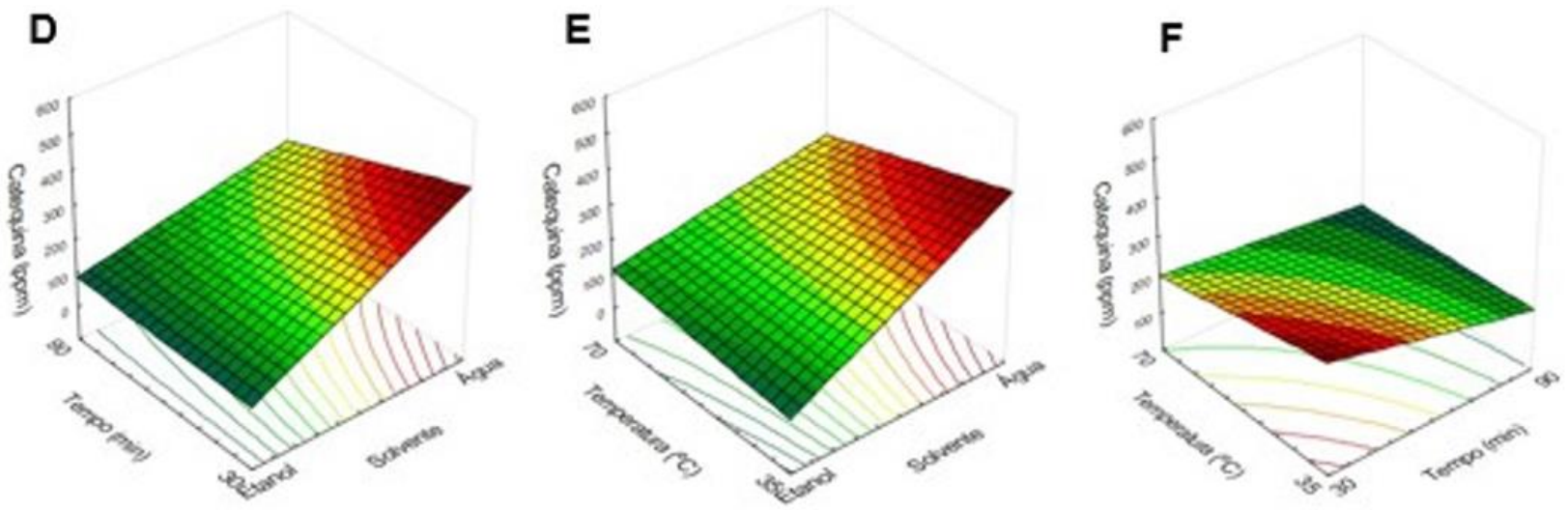

Figura 32 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de catequina obtido por CLAE a partir dos extratos de folha de *C. lechleri.* (D: solvente e tempo; E: solvente e temperatura; F: tempo e temperatura).

Epicatequina

Na extração de epicatequina da folha de *C. lechleri* o maior teor foi obtido com o uso de água a 70 ºC e 30 minutos de extração. A Figura 33 mostra o gráfico de Pareto, onde é possível observar que os fatores temperatura e tempo, bem como a interação tempo e temperatura foram significativos no teor de epicatequina extraído.

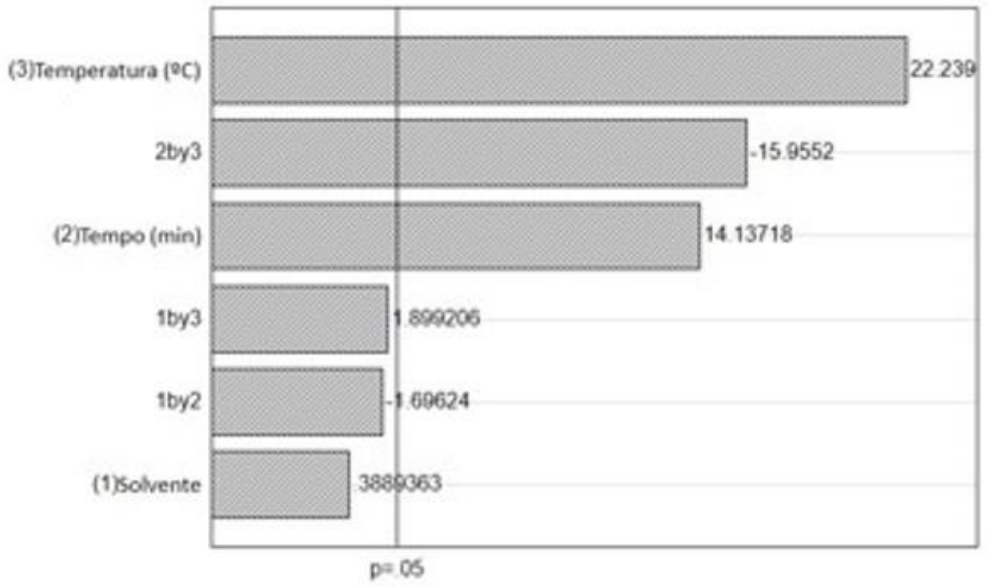

Figura 33 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração de epicatequina por meio de CLAE a partir do extrato de folha de *C. lechleri.*

Além disso, o efeito positivo da temperatura e tempo indicam que uma mudança em seus valores nos sentidos positivos de temperatura e tempo resultariam no aumento no teor de epicatequina. A interação tempo e temperatura significativa denota que a extração de epicatequina da folha de *C. lechleri* é favorecida com o uso de temperatura a 70 ºC.

O modelo gerado por regressão linear múltipla levando em consideração somente os efeitos significativos para a quantificação de epicatequina proveniente dos extratos de folha de *C. lechleri* resulta na Equação 13 obteve

de coeficiente de correlação de 0.991, indicando que os modelos matemáticos se ajustam bem aos dados experimentais.

$$EPIfolhas = 16.67 + 5.81x_3 + 3.69x_2 - 4.17x_2x_3 \qquad (Eq.13)$$

A partir do modelo matemático são gerados os gráficos de superfície de resposta apresentados na Figura 34, que confirma a modelagem multivariada dos dados, apresentando tempo e temperatura como os fatores significativos no teor de epicatequina extraída da folha de *C. lechleri.*

O teor de epicatequina obtido a partir de folhas de *C. lechleri* não apresentou diferença significativa quanto ao solvente empregado. Contudo, os maiores teores foram obtidos com o uso de temperatura mais alta. A epicatequina pode ser de difícil extração devida a sua interação com os tecidos das plantas ligados fortemente a açúcares e proteínas. Dessa forma, faz-se necessário o emprego de maior temperatura para que ocorra a quebra das interações intermoleculares entre os compostos e suas matrizes.

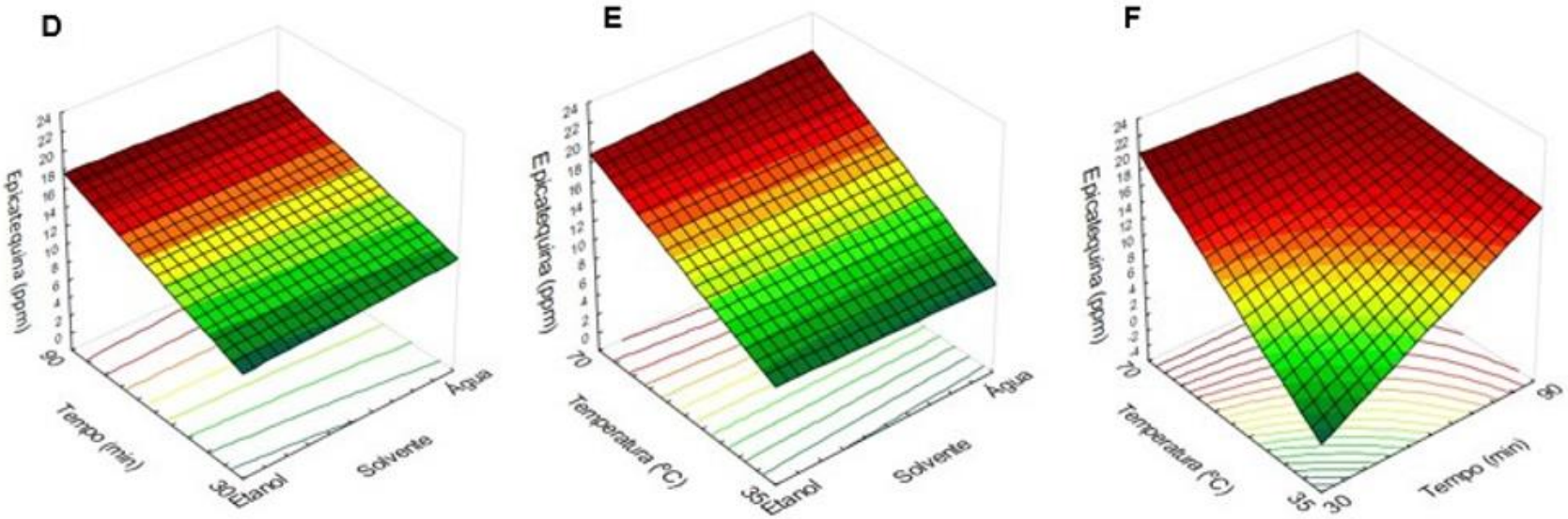

Figura 34 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de epicatequina obtido por CLAE a partir dos extratos de folhas de *C. lechleri.* (D: solvente e tempo; E: solvente e temperatura; F: tempo e temperatura).

Ácido Siríngico

O ácido siríngico foi melhor extraído da folha de *C. lechleri* com o uso do solvente água, 90 minutos a 35 ºC. Analisando o gráfico de Pareto na Figura 35, foi possível observar que os fatores solvente e tempo e as interações tempo e temperatura e solvente e tempo foram significativas na extração do composto.

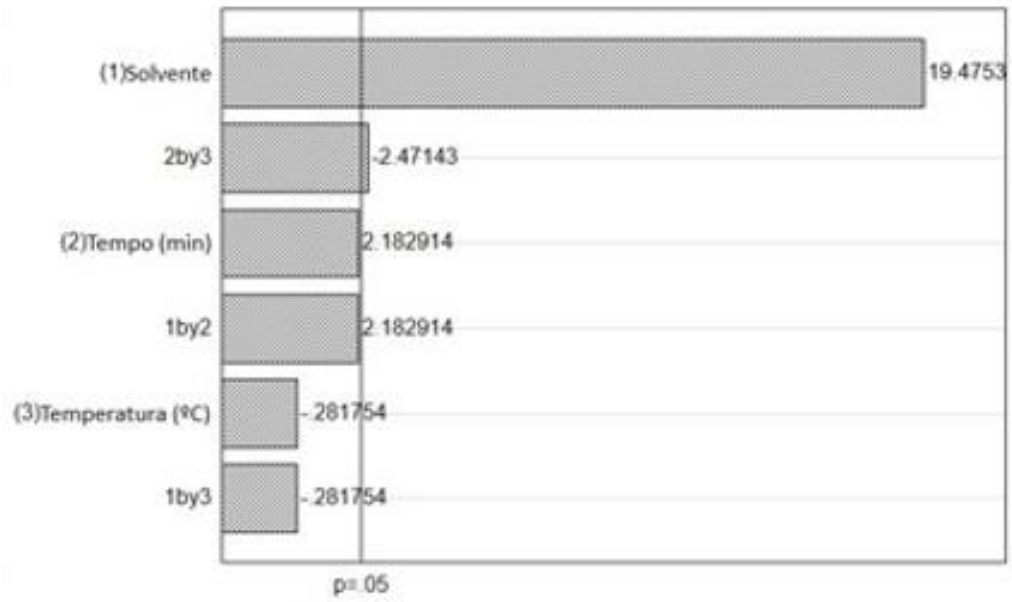

Figura 35 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração de ácido siríngico dos extratos da folha de *C. lechleri* por meio de CLAE.

O efeito positivo do solvente e tempo indicam que uma mudança em seus valores nos sentidos positivos acarretaria no aumento do teor de ácido siríngico obtido. As interações tempo e temperatura e solvente e tempo significativas mostram que o teor de ácido siríngico obtido da folha de *C. lechleri* é favorecido com o uso de água como solvente extrator, a temperatura de 35 ºC durante 90 minutos de extração.

O modelo gerado por regressão linear múltipla, levando em consideração os efeitos significativos dão origem a Equação 14, apresentando

coeficiente de correlação de 0,978, indicando que os modelos matemáticos se ajustam bem aos dados experimentais.

$$ASfolhas = 29.51 + 29.51x_1 - 3.74x_2x_3 \qquad (Eq. 14)$$

Os modelos matemáticos dão origem aos gráficos de superfície de resposta apresentados na Figura 36, que confirmam a modelagem multivariada, indicando a melhor condição de extração como temperatura de 35 ºC durante 90 minutos, sendo a água o melhor solvente.

Da mesma forma como ocorreu na extração de ácido siríngico a partir de casca e folhas de *C. lechleri*, a extração do composto do resíduo de seiva também foi favorecida pelo uso de água como solvente extrator. Contudo, para obtenção deste a partir do resíduo de seiva, foi necessário o emprego de maior temperatura e tempo de extração, indicando maior dificuldade de retirada do mesmo a partir desta matriz.

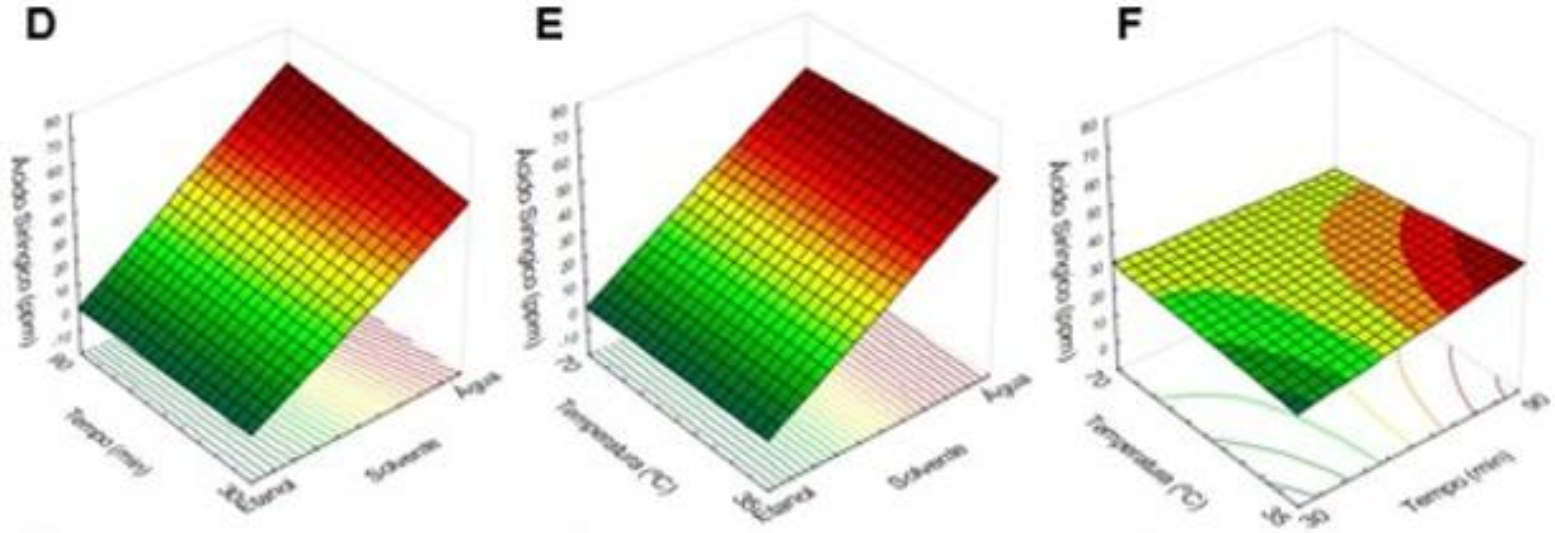

Figura 36 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de ácido siríngico obtido por CLAE a partir dos extratos da folha de *C. lechleri.* (D: solvente e tempo; E: solvente e temperatura; F: tempo e temperatura).

Ácido cumárico

O ácido cumárico foi extraído das folhas de *C. lechleri* em maiores concentrações com o uso do solvente água a temperatura de 30 ºC e 30 e 90 minutos de extração e 70 ºC durante 30 minutos de extração. O gráfico de Pareto apresentado na Figura 37 mostra que o fator solvente e as interações solvente e tempo, solvente e temperatura e tempo e temperatura foram significativos (p<0,05) na extração do composto.

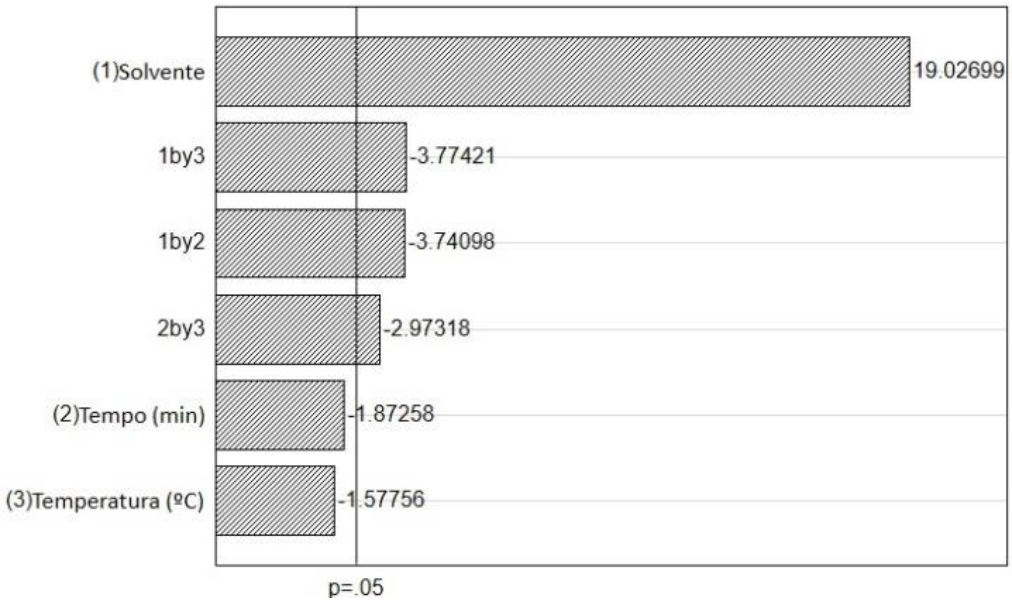

Figura 37 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração de ácido cumárico por meio de CLAE.

O efeito do solvente foi positivo, indicando que uma mudança em seu valor no sentido positivo do solvente (água) acarretaria no aumento do teor de ácido cumárico. O modelo matemático gerado por regressão linear múltipla levando em consideração os efeitos significativos obteve valor de coeficiente de correlação igual a 0,978, indicando que o modelo se ajusta aos dados experimentais, conforme mostra a Equação 15.

$$ACfolha^1 = 87.00 + 66.72x_1 - 13.12x_1x_2 - 13.23x_1x_3 - 10.43x_2x_3 \qquad (Eq.15)$$

Os modelos matemáticos geram os gráficos de superfície de resposta mostrados na Figura 39, onde pode-se concluir que a água foi o melhor solvente.

No gráfico relacionando tempo e temperatura, foi possível observar que quando a temperatura é alta, tem-se maiores teores do composto em tempo mais curtos e quando a temperatura é menor, faz-se necessário o prolongamento do tempo de extração para se obter a mesma concentração do composto.

O ácido cumárico é um ácido fenólico do grupo dos ácidos hidroxicinâmicos, derivado do ácido cinâmico com um grupamento hidroxila no carbono 4 do anel benzênico, conforme mostra a Figura 38.

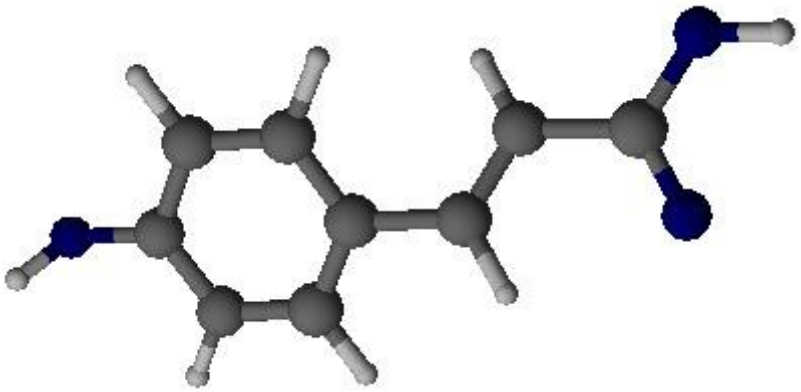

Figura 38 - Estrutura do ácido cumárico.

O ácido cumárico foi melhor extraído das folhas de *C. lechleri* com o uso de água como solvente extrator. A melhor relação do composto com a água pode ser atribuída a alta polaridade que a presença dos grupos OH conferem à molécula. Além disso, o impedimento estéreo causado pelas nuvens eletrônicas dos oxigênios da molécula e das hibridizações π oriundas das duplas ligações tornam difícil a interação da parte hidrofóbica da molécula com a parte apolar do etanol.

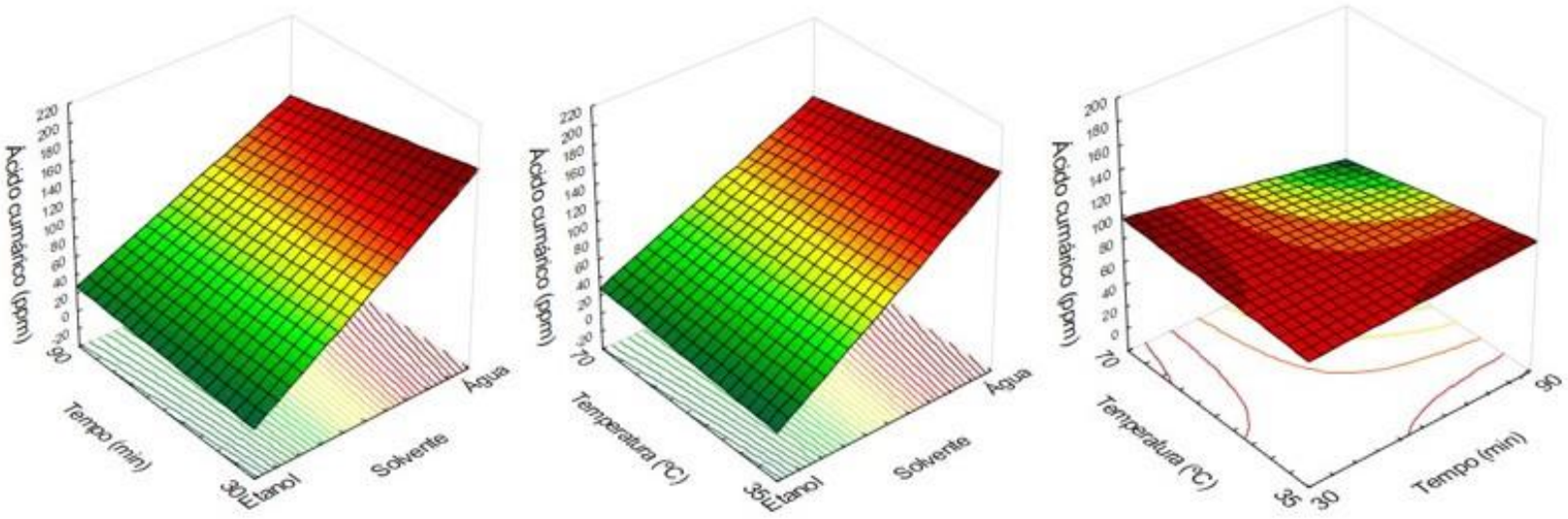

Figura 39 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de ácido cumárico obtido por CLAE a partir dos extratos de folha de *C. lechleri.* (D: solvente e tempo; E: solvente e temperatura; F: tempo e temperatura).

Ácido ferrúlico

O ácido ferrúlico foi quantificado somente nos extratos obtidos com a folha de *C. lechleri*. O maior teor do composto (108,89 $\mu g g^{-1}$) foi obtido com o uso do solvente água a temperatura de 35 ºC e 30 minutos de extração. A Figura 40 apresenta o gráfico de Pareto que mostra que os fatores solvente e tempo, bem como as interações do solvente com o tempo e a temperatura foram significativos no teor de ácido ferrúlico obtido da amostra.

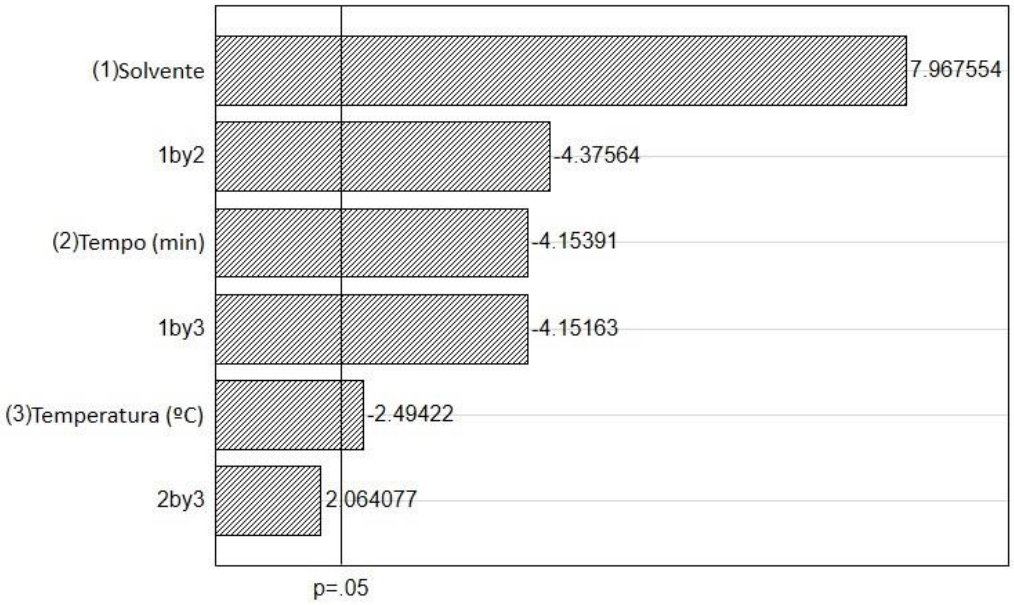

Figura 40 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração de ácido ferrúlico por meio de CLAE

O efeito do solvente foi positivo, indicando que uma mudança em seu valor no sentido positivo do solvente (água) acarretaria no aumento do teor de ácido ferrúlico. Por outro lado, o efeito do tempo foi negativo, indicando que a mudança de tempo em seu menor nível para níveis maiores resultaria em diminuição nos teores de ácido ferrúlico.

O modelo matemático gerado por regressão linear múltipla levando em consideração os efeitos significativos fornece a Equação 16. O valor do

coeficiente de correlação igual a 0,934 indica que o modelo matemático se ajusta bem aos dados experimentais.

$$AFfolha^1 = 45.01 + 18.39x_1 - 9.59x_2 - 5.76x_3 - 10.10x_1x_2 - 9.58x_1x_3 \quad (Eq.16)$$

A partir da modelagem matemática são gerados os gráficos de superfície de resposta para a variável dependente ácido ferrúlico, apresentados na Figura 42. Foi possível observar que os maiores teores de ácido ferrúlico foram obtidos quando se utilizou água como solvente, com 30 minutos de extração à temperatura de 35 ºC.

O ácido ferrúlico é, assim como o ácido cumárico, um ácido hidroxicinâmico derivado do ácido cinâmico com um grupamento éter metílico no carbono 3 e um grupamento hidroxila no carbono 4 do anel benzênico, conforme mostra a Figura 41.

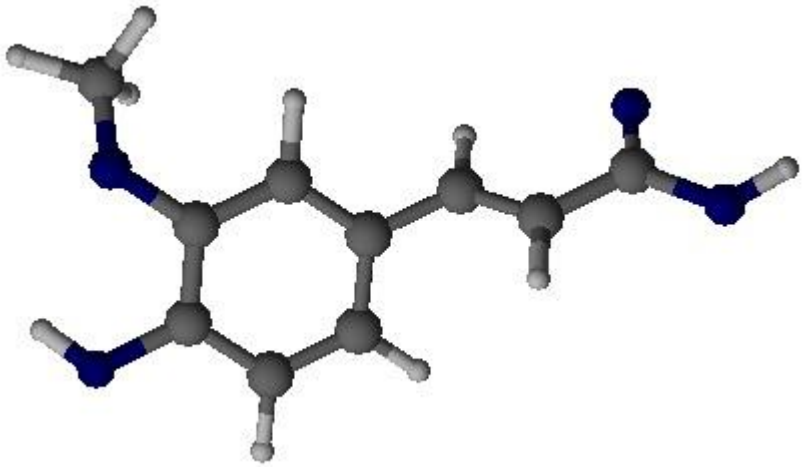

Figura 41- Estrutura do ácido ferrúlico.

Os maiores teores de ácido ferrúlico a partir da folha de *C. lechleri* foram obtidos com o uso de água como solvente extrator. O Substituinte éter, assim como o grupamento ácido carboxílico e substituinte OH conferem alta polaridade a molécula, explicando a maior extração do composto com o uso de água, solvente mais apolar que etanol.

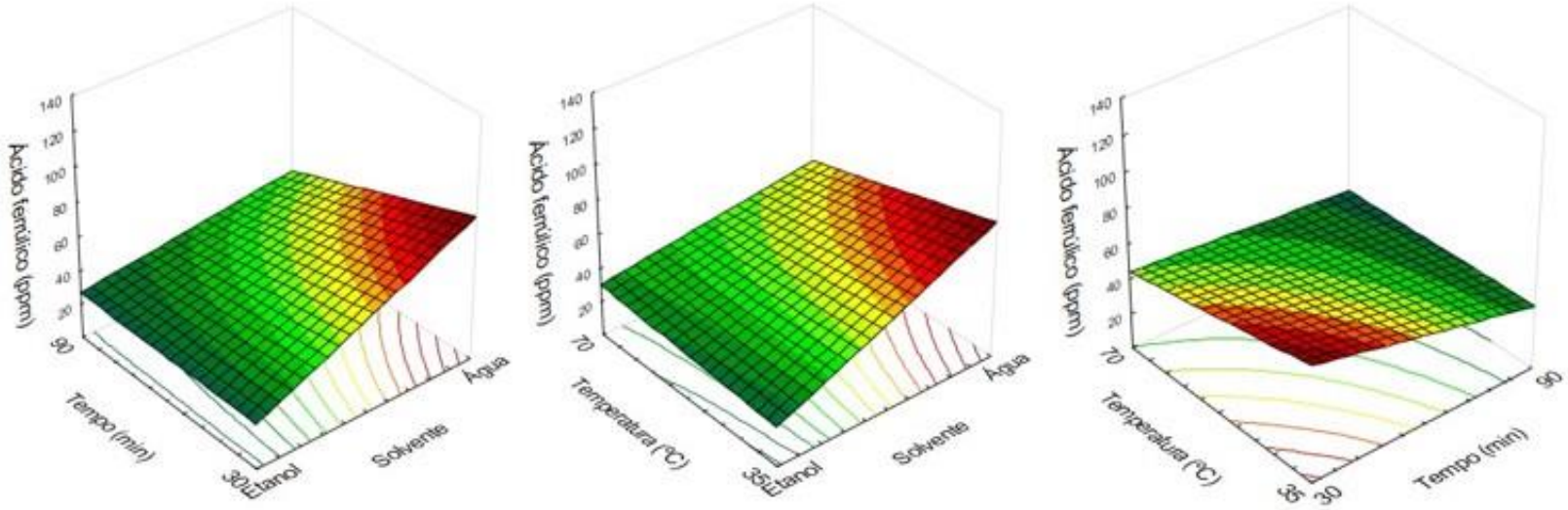

Figura 42 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de ácido ferrúlico obtido por CLAE a partir dos extratos de *C. lechleri.* (D:solvente e tempo; E: solvente e temperatura; F: tempo e temperatura).

A Figura 43 apresenta a análise de componentes principais para os dados da extração de compostos fenólicos da folha de *C. lechleri* através de CLAE.

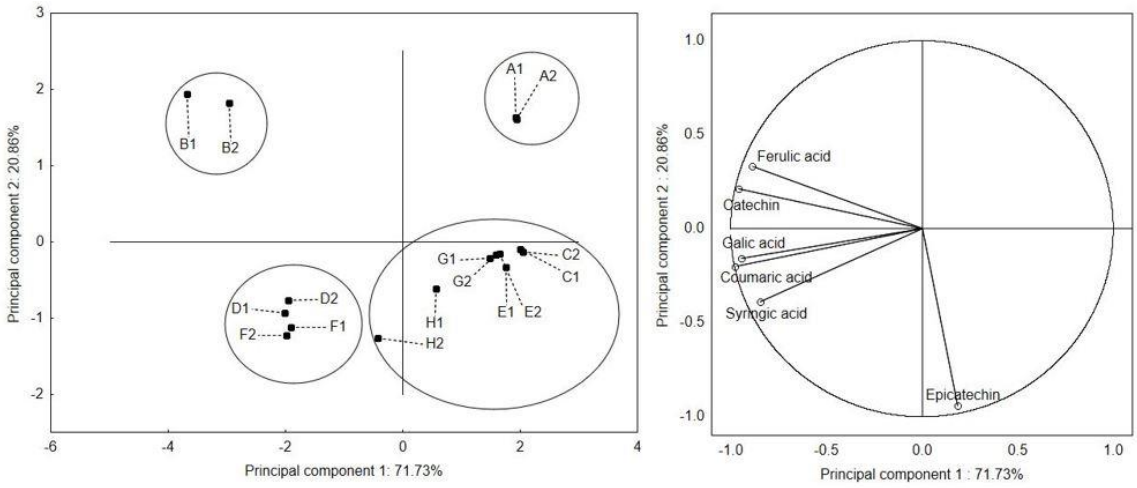

Figura 43 - Análise de componentes principais (PCA) para os dados obtidos através na análise cromatográfica dos extratos de folha de *C. lechleri.* Distribuição das condições de extração no gráfico de escores (esquerda) e distribuição dos compostos isolados no gráfico de pesos (direita).

A partir dos dados de PCA apresentados na Figura 43, foi possível observar que PC1 descreveu 71,73 % da variância total, enquanto PC2 descreveu 20,86%, somando 92,52 da variância total. PC1 versus PC2 foram alocados em quatro grupos: O grupo formado pelos ensaios A localizados no primeiro quadrante não demonstrou altos valores dos compostos isolados, o que significa que o etanol não foi tão eficiente quanto água como solvente para a extração conduzida nas menores condições de tempo e temperatura (30 minutos e 35 ºC). No segundo quadrante, por outro lado, os compostos fenólicos; ácido ferrúlico e catequina estão presentes como melhores extraídos nestas condições com o uso de etanol como solvente extrator, conforme condição (tratamento) B. Ácido gálico, ácido cumárico e ácido siríngico mostraram-se melhores extraídos nas condições D e F, como mostram suas posições no terceiro quadrante, utilizando-se água como solvente extrator e tempo e temperatura de extração sendo máximo e mínimo, ou vice-versa (30

min e 70 ºC ou 90 min e 35ºC). Epicatequina foi o composto mais estável extraído da folha de *C. lechleri,* resistindo a temperatura de 70 ºC durante 90 minutos de extração e podendo ser extraída tanto com água ou etanol, já que o solvente não foi significativo.

O extrato aquoso de folhas de *Croton ssp.* originária da Amazônia por Da Silva Port's et al. (2013) apresentou teor de CFT de 26,02 mg EAG g^{-1}, enquanto os extratos etanolicos de *Croton argyatus, Croton argentinus* e *Croton bonplandianum* apontaram valores maiores de 40,62, 50,50 e 75,39 mg EAG g^{-1}, respectivamente Dutta et al. (2013 e N. I. Mohd Ali, (2012). Silva, Rogez e Larondelle (2007) estudou a variação do teor CFT nos extratos hidroalcoólicos de folhas de *Inga edulis,* também da família *Euphorbiaceae* na variação de temperatura entre 15 e 95 ºC, estabelecendo valores ótimos de 65,2 ºC para rendimento satisfatório e garantindo a estabilidade de compostos bioativos.

Johns's et al. (1999) obtiveram valores de CFT de 7,5 e 6,9 mg EAG.g^{-1} para os extratos aquosos de *Croton dicogamous* e *Croton megalocarpus* originárias da Tanzânia. Silva et al. (2006), estudou a variação do teor CFT nos extratos hidroalcoólicos de folhas de *Inga edulis,* também da família *Euphorbiaceae* na variação de temperatura entre 15 e 95 ºC, estabelecendo valores ótimos de 65,2 ºC para rendimento satisfatório e garantir a estabilidade dos compostos bioativos.

5.3 RESULTADOS OBTIDOS COM O USO DE EXTRATOS DE RESÍDUO DE SEIVA DE *C. LECHLERI*

5.3.1 Teor de compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante dos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri*

O teor de compostos fenólicos totais nos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri* variou de 61,45 a 192,32, EAG g^{-1}; sua atividade antioxidante de

0,07 a 19,91 µmol de Trolox g^{-1} e o teor de antocianinas totais no extrato de resíduo de seiva variou de 2,48 a 21,71 g/100g conforme mostra a Tabela 10.

Tabela 10 – Resultados obtidos referente ao delineamento fatorial para CFT (mg EAG.g^{-1}) e AA (µmol de Trolox. g^{-1}) em extratos da folha de *C. lechleri.*

Ensaios	Variáveis			Resíduo		
	X1	X2 (min.)	X3 (°C)	TCF (mg EAG/g)	AA (µmol Trolox/g)	TA (g/100g)
A	Etanol	30	35	61,45 ± 3,65 ^{f}	1,67 ± 0,02 ^{e}	2,48 ± 0,24 ^{c}
B	Água	30	35	77,77 ± 2,87 ^{e}	1,80 ± 0,01 ^{de}	5,27 ± 0,53 ^{c}
C	Etanol	90	35	89,28 ± 3,73 ^{d}	4,29 ± 1,04 ^{b}	3,97 ± 0,51 ^{c}
D	Água	90	35	147,20 ± 4,05 ^{c}	2,46 ± 0,22 ^{cde}	12,29 ± 1,27 ^{b}
E	Etanol	30	70	95,13 ± 1,98 ^{d}	3,00 ± 0,15 ^{bcd}	4,41 ± 0,30 ^{c}
F	Água	30	70	173,71 ± 1,82 ^{b}	0,07 ± 0,07 ^{f}	21,71 ± 1,83 ^{a}
G	Etanol	90	70	192,32 ± 0,56 ^{a}	3,39 ± 0,17 ^{bc}	10,90 ± 1,05 ^{b}
H	Água	90	70	167,73 ± 1,23 ^{b}	19,91 ± 2,40 ^{a}	20,04 ± 2,83 ^{a}

Médias ± desvio padrão; médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p<0,05$). CFT: Compostos fenólicos totais; AA: Atividade antioxidante; AT: Antocianinas totais EAG: Equivalente em ácido gálico.

Tabela 11 – Valores de ANOVA para os resultados CFT, AA e AT obtidos com o resíduo de seiva de *C. lechleri.*

Fatores	Compostos fenólicos				
	Soma dos Quadrados	**GL**	**Média dos Quadrados**	**F-calculado**	**p-valor**
Solvente (X1)	6166.67	1	6166.67	13.13865	**0.002093**
Tempo (X2)	13321.50	1	13321.50	28.38269	**0.000056**
Temperatura (X3)	24038.66	1	24038.66	51.21657	**0.000002**
X1;X2	1421.54	1	1421.54	3.02872	0.099871
X1;X3	153.66	1	153.66	0.32738	0.574697
X2;X3	13.70	1	13.70	0.02920	0.866338
Resíduo	7979.00	17	469.35		
Total	53094.74	23			
Fatores	**Atividade Antioxidante**				
	Soma dos Quadrados	**GL**	**Média dos Quadrados**	**F-calculado**	**p-valor**
Solvente (X1)	114.9734	1	114.9734	526.444	**0.000000**
Tempo (X2)	3.5187	1	3.5187	16.111	**0.000900**
Temperatura (X3)	344.3013	1	344.3013	1576.498	**0.000000**
X1;X2	81.4360	1	81.4360	372.882	**0.000000**
X1;X3	149.2831	1	149.2831	683.542	**0.000000**
X2;X3	34.2879	1	34.2879	156.998	**0.000000**
Resíduo	3.7127	17	0.2184		
Total	731.5130	23			
Fatores	**Antocianinas Totais**				
	Soma dos Quadrados	**GL**	**Média dos Quadrados**	**F-calculado**	**p-valor**
Solvente (X1)	528.217	1	528.2166	89.99577	**0.000000**
Tempo (X2)	66.605	1	66.6053	11.34799	**0.003647**
Temperatura (X3)	409.679	1	409.6794	69.79980	**0.000000**
X1;X2	2.596	1	2.5959	0.44228	0.514945
X1;X3	88.246	1	88.2456	15.03500	**0.001209**
X2;X3	5.113	1	5.1131	0.87115	0.363706
Resíduo	99.779	17	5.8693		
Total	1200.235	23			

GL=Graus de liberdade; Resultados em negrito referem-se a diferenças significativos ($p<0,05$).

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos da análise de variância (ANOVA) para os extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri.*

Os compostos fenólicos do resíduo de seiva foram melhor extraído nas utilizando-se etanol como solvente, tempo de 90 minutos a 70 ºC. Sendo que os fatores solvente, tempo e temperatura significativos ($p \leq 0,05$), conforme ANOVA.

Atividade antioxidante apresentou maiores valores com o emprego de água, a 70 ºC por 90 minutos, sendo todos os fatores e suas interações significativos neste resultado.

Os gráficos de Pareto da Figura 44 apresentaram valores positivos e significativos para os fatores temperatura, tempo e solvente para os três resultados investigados.

Para o teor de CFT, os efeitos positivos do solvente, tempo e temperatura indicam que mudanças em seus valores nos sentidos positivos acarretariam no aumento do teor de CFT obtido a partir do resíduo de seiva de *C. lechleri.* As interações, por outro lado, não foram significativas.

Na análise do teor de antocianinas totais, os efeitos dos fatores solvente, tempo e temperatura, bem como da interação solvente e temperatura foram significativos ($p<0,05$). Além disso, os efeitos positivos do solvente, tempo e temperatura indicam que mudanças em seus valores nos sentidos positivos acarretariam no aumento do teor de antocianinas obtidas a partir do resíduo de seiva de *C. lechleri.*

A atividade antioxidante, por sua vez apresenta todos os fatores e todas as interações como significativas na variável dependente atividade antioxidante dos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri.* Mais uma vez, os efeitos positivos dos fatores indicam que o aumento em seus valores no sentido positivo resultaria no aumento da atividade antioxidante.

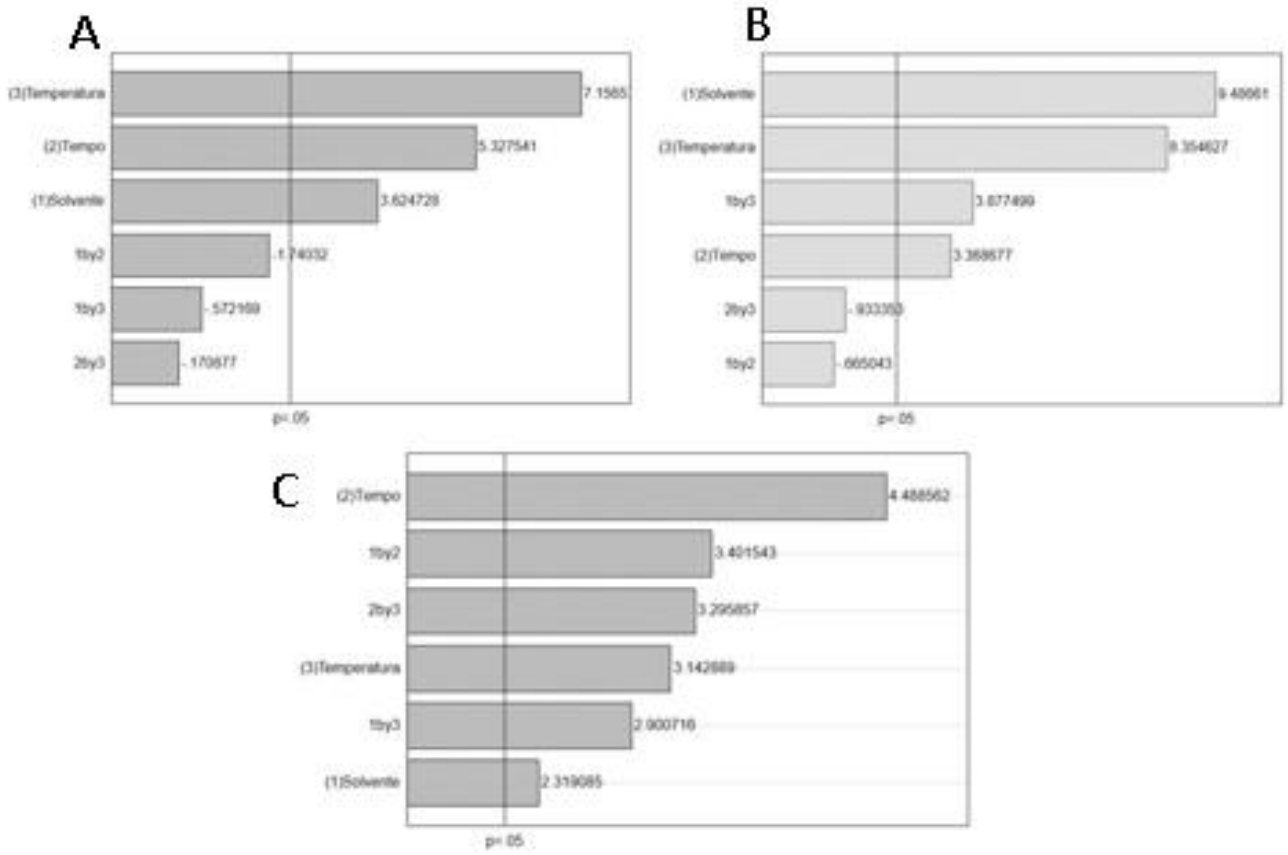

Figura 44- Gráficos de Pareto CFT (A), Antocianinas totais (B) e AA (C) dos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri.*

Os resultados obtidos regressão linear múltipla levando em consideração os efeitos significativos deram origem aos modelos ajustados para as variáveis dependentes fenólicos totais, atividade antioxidante e antocianinas para resíduo de seiva de *C. lechleri*, conforme mostra a Tabela 12.

Tabela 12 - Modelos gerados por regressão linear múltipla para as variáveis dependentes, compostos fenólicos, atividade antioxidante em função dos fatores; tipo de solvente, tempo e temperatura.

Equação	Modelo Gerado	Coeficiente de Correlação (R^2)
17	$CFT\ resíduo\ seiva = 125.57 + 16.03\ x_1 + 23.56\ x_2 + 31.65\ x_3$	0.849
18	$AA\ resíduo = 4.54 + 1.50x_1 + 2.90x_2 + 2.03\ x_3 + 2.20\ x_1x_2 + 1.88\ x_1x_3 + 2.13\ x_2x_3$	0.995
19	$Antocinainas\ resíduo\ seiva = 10.13 + 4.69x_1 + 1.67x_2 + 4.13\ x_3 + 1.92\ x_1x_3$	0.917

Respostas: CFT: compostos fenólicos totais; AA: atividade antioxidante.

Os valores de coeficiente de correlação de 0,849, 0,995 e 0,917 indicam que os modelos utilizados se ajustam aos dados experimentais. A Figura 45 mostra as superfícies de resposta obtidas para compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos obtidos do resíduo da seiva de *C. lechleri.*

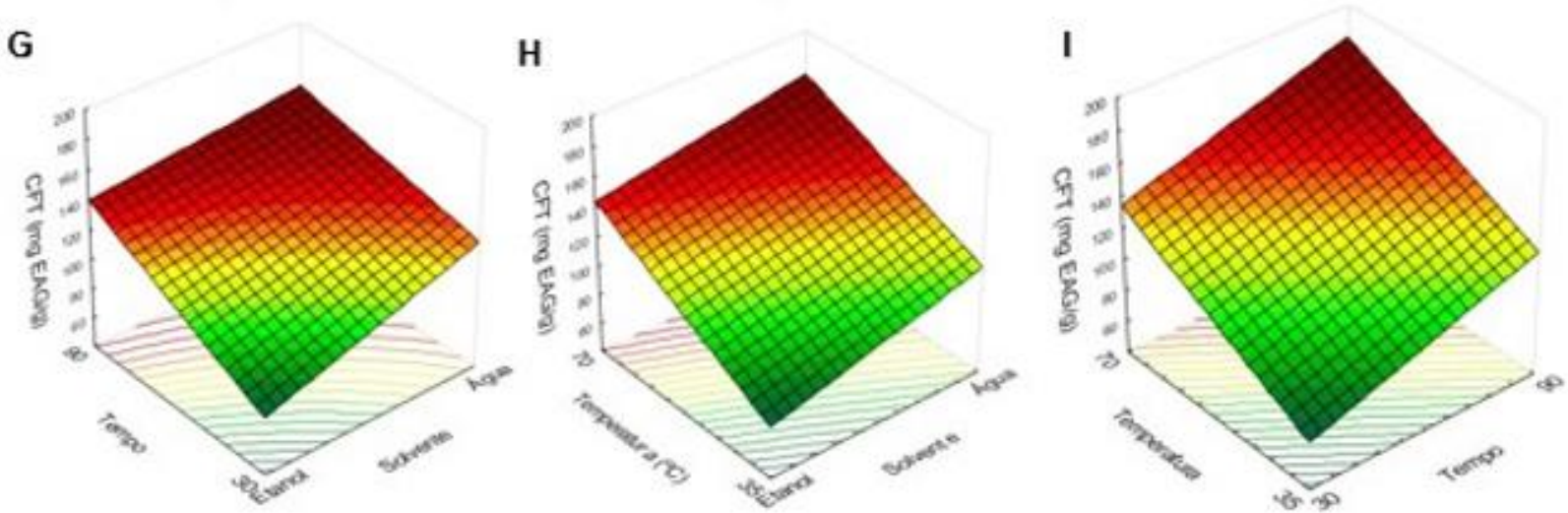

Figura 45 - Gráficos de superfície para compostos fenólicos totais dos extratos obtidos do resíduo de seiva de *C. lechleri.* (G: solvente e tempo; H: solvente e temperatura; I: tempo e temperatura).

Entre as amostras de *C. lechleri* utilizadas, os extratos obtidos com resíduos de seiva apresentaram maior teor de compostos fenólicos totais comparados aos extratos de cascas e folhas. A temperatura de 70 ºC, o tempo de 90 minutos e o uso de água como solvente foram determinantes na extração de compostos fenólicos.

A Figura 46 apresenta os gráficos de superfície de resposta para a variável dependente atividade antioxidante (AA) dos extratos obtidos do resíduo de seiva de *C. lechleri* obtida pelo método de sequestro do radical DPPH. Pode-se observar que água, a 70 ºC e 90 minutos de extração obtiveram os maiores valores de atividade antioxidante para o extrato estudado.

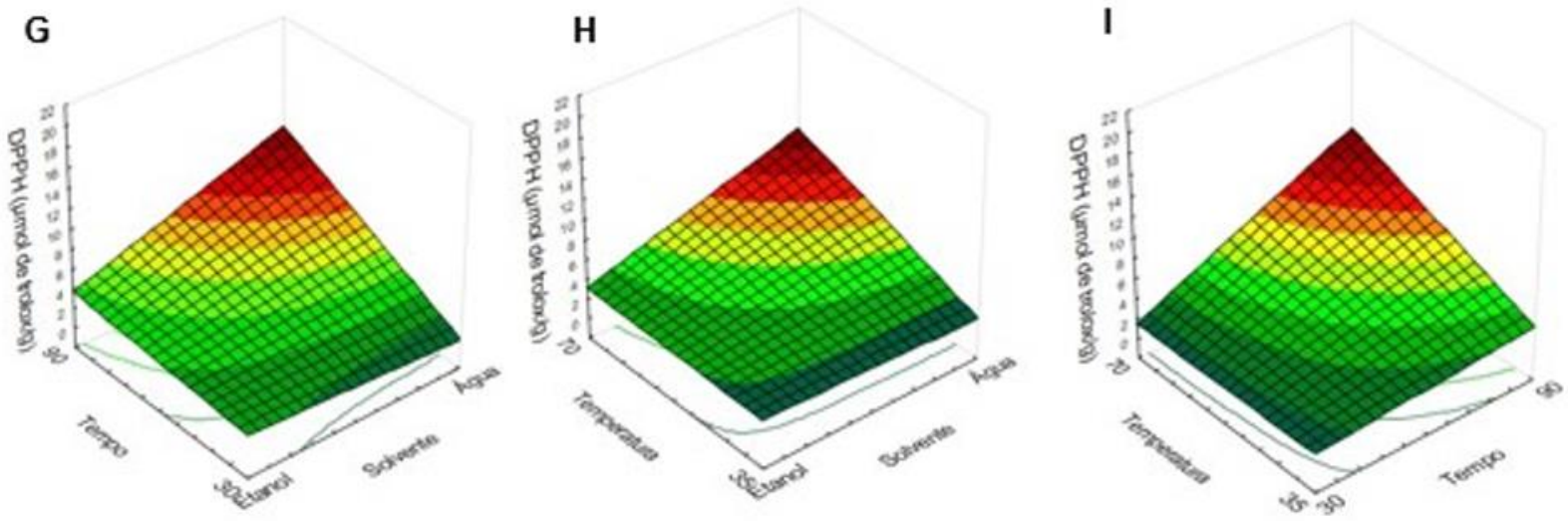

Figura 46 - Gráficos de superfície para atividade antioxidante dos extratos obtidos do resíduo de seiva de *C. lechleri.* (D: solvente e tempo; E: solvente e temperatura; F: tempo e temperatura).

Para a variável teor de antocianinas, a água e 70 ºC possibilitaram melhor extração quando relacionadas as variáveis solvente e temperatura, conforme mostra a Figura 47. Pode-se observar também que o tempo de extração, embora significativo, não representou tanto impacto no teor de antocianinas.

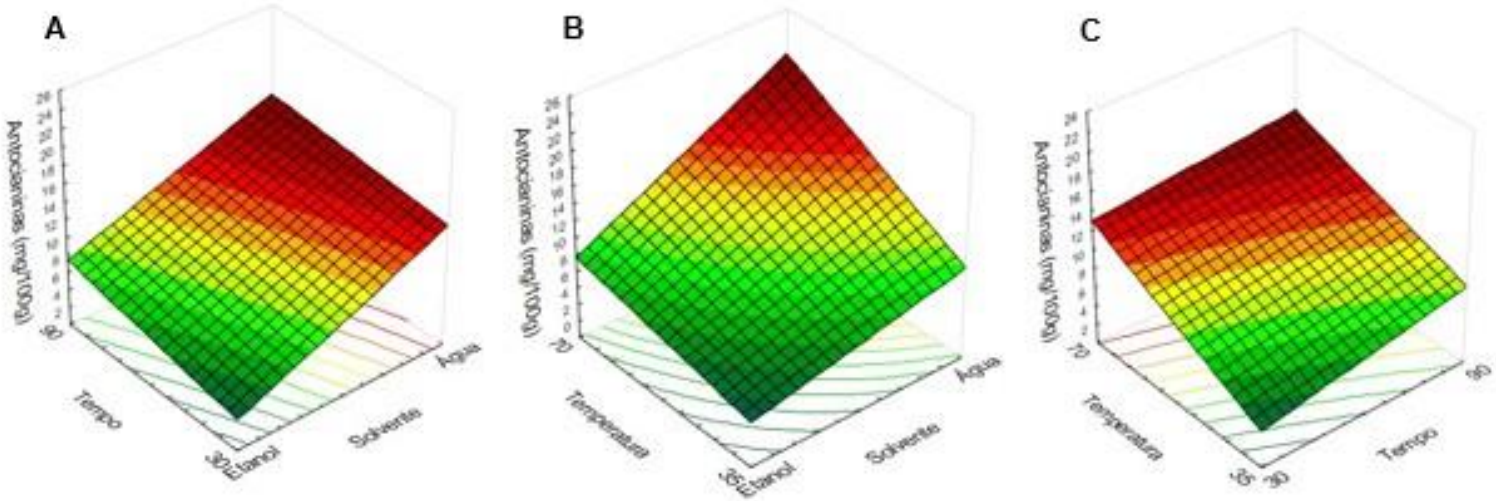

Figura 47 - Gráficos de superfície para antocianinas totais dos extratos obtido do resíduo de seiva de *C. lechleri.* (A: solvente e tempo; B: solvente e temperatura; C: tempo e temperatura).

5.3.2 Determinação de compostos fenólicos do resíduo de seiva de *C. lechleri* por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Nos extratos obtidos com o resíduo de *C. lechleri* foram identificados os seguintes compostos fenólicos: ácido gálico, ácido siríngico, catequina e epicatequina. Para cada composto fenólico em cada extrato foram determinados os limites de detecção (LD), e quantificação (LQ). A Tabela 13 mostra os compostos fenólicos identificados por CLAE obtidos o extrato do resíduo, nas condições de extração.

Tabela 13 – Perfil dos compostos fenólicos quantificados por CLAE nos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri.*

	Ácido gálico (μgg^{-1})	**Catequina (μgg^{-1})**	**Epicatequina (μgg^{-1})**	**Ácido siríngico (μgg^{-1})**
LD (μgg^{-1})	1,386641	1,977346	3,705455	1,128451
LQ (μgg^{-1})	4,622135	6,591153	12,35152	3,761505
TR (min.)	3,24 ± 0,28	8,51± 0,89	13,73 ± 0,77	13,06 ± 0,14
λ (nm)	272	260 e 290	276	274
A	132,44 ± 7,93 ^{cd}	91,64 ± 5,58 ^{e}	19,60 ± 1,63 ^{e}	24,46 ± 1,48 ^{e}
B	57,44 ± 1,25 ^{d}	452,51 ± 8,17 ^{b}	27,41 ± 1,97 ^{cd}	26,63 ± 2,92 ^{de}
C	189,75 ± 8,52 ^{b}	84,29 ± 1,30 ^{e}	19,34 ± 1,50 ^{e}	24,22 ± 1,73 ^{e}
D	74,22 ± 3,48 ^{cd}	88,80 ± 12,1 ^{e}	36,00 ± 1,85 ^{b}	45,04 ± 1,61 ^{d}
E	455,86 ± 7,72 ^{a}	113,14 ± 11,7 ^{e}	36,47 ± 1,72 ^{cde}	24,31 ± 1,23 ^{e}
F	170,85 ± 1,63 ^{b}	301,85 ± 28,0 ^{c}	74,72 ± 0,29 ^{a}	44,70 ± 0,31 ^{b}
G	94,88 ± 2,08 ^{cd}	155,41 ± 8,62 ^{d}	24,55 ± 1,15 ^{cde}	28,69 ± 2,15 ^{d}
H	145,35 ± 2,67 ^{bc}	1947,38 ± 69,9 ^{a}	31,35 ± 0,75 ^{bc}	113,91 ± 1,71 ^{a}

*LD= Limite de detecção; LQ=Limite de quantificação; TR=Tempo de retenção; λ=Comprimento de onda. Médias ± desvio padrão; médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Ácido gálico

O ácido gálico foi extraído do resíduo de seiva de *C. lechleri* em maiores concentrações (455,86 $\mu g g^{-1}$) com o uso de etanol à temperatura de 70 ºC durante 30 minutos de extração. A Figura 48 apresenta o gráfico de Pareto, que mostra que apenas o fator solvente e a interação tempo e temperatura foram significativos no teor de ácido gálico obtido do resíduo de seiva de *C. lechleri.*

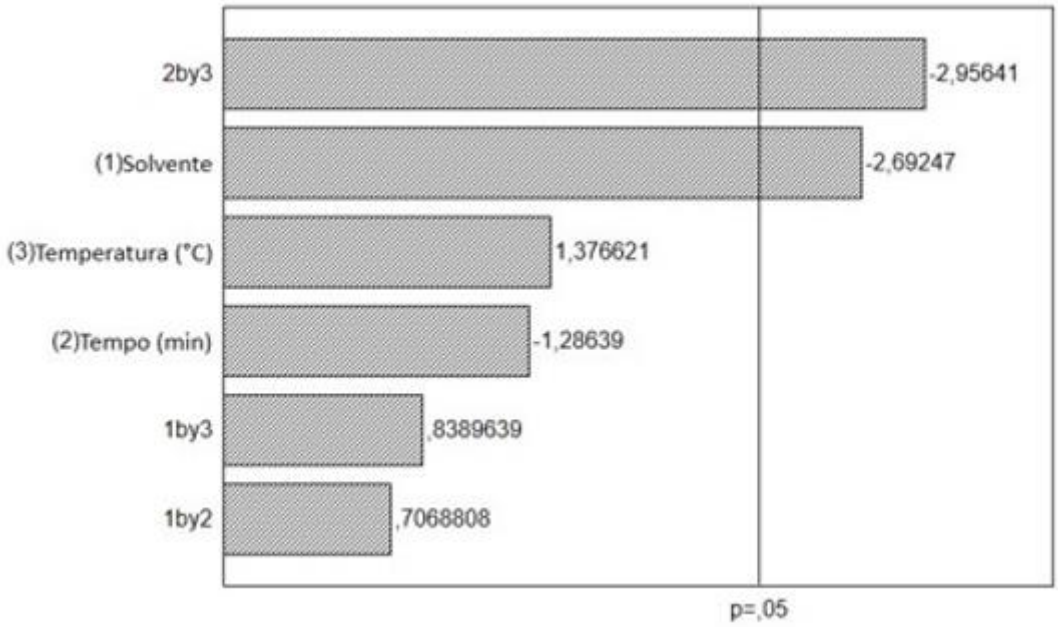

Figura 48 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para o ácido gálico por meio de CLAE em extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri.*

O efeito negativo do solvente indica que a mudança de solvente em seus menores níveis para níveis maiores resultaria na diminuição do teor de ácido gálico obtido. A interação tempo e temperatura significativa denota que a extração do ácido gálico a partir do resíduo de seiva de *C. lechleri* é favorecida pelo emprego de temperaturas mais altas durante curtos tempos de extração.

O modelo gerado por regressão linear múltipla levando em consideração somente os efeitos significativos para a variável dependente ácido gálico para

resíduo de seiva de *C. lechleri* obtive valor de coeficiente de correlação de 0,697, apresentados Equação 20, indicando que o modelo matemático se ajusta aos dados experimentais.

$$AGresíduo = 193.11 - 68.57x_1 - 75.29x_2x_3 \quad (Eq.20)$$

A partir do modelo matemático, são obtidos os gráficos de superfície de resposta apresentados na Figura 49, onde é possível observar que ácido gálico foi melhor extraído do resíduo de seiva com o emprego de etanol como solvente. Além disso, este composto necessitou de 70 ºC de temperatura para ser extraído do resíduo, enquanto que o tempo que melhor apresentou altos teores de ácido gálico foi de 30 minutos.

O ácido gálico foi extraído em maiores teores do resíduo de seiva de C. lechleri com o uso de etanol. Este acontecimento pode ser atribuído ao caráter hidrofóbico do anel aromático que interage com a fase apolar do etanol, enquanto que a parte hidrofílica da molécula interage com a cabeça polar do solvente.

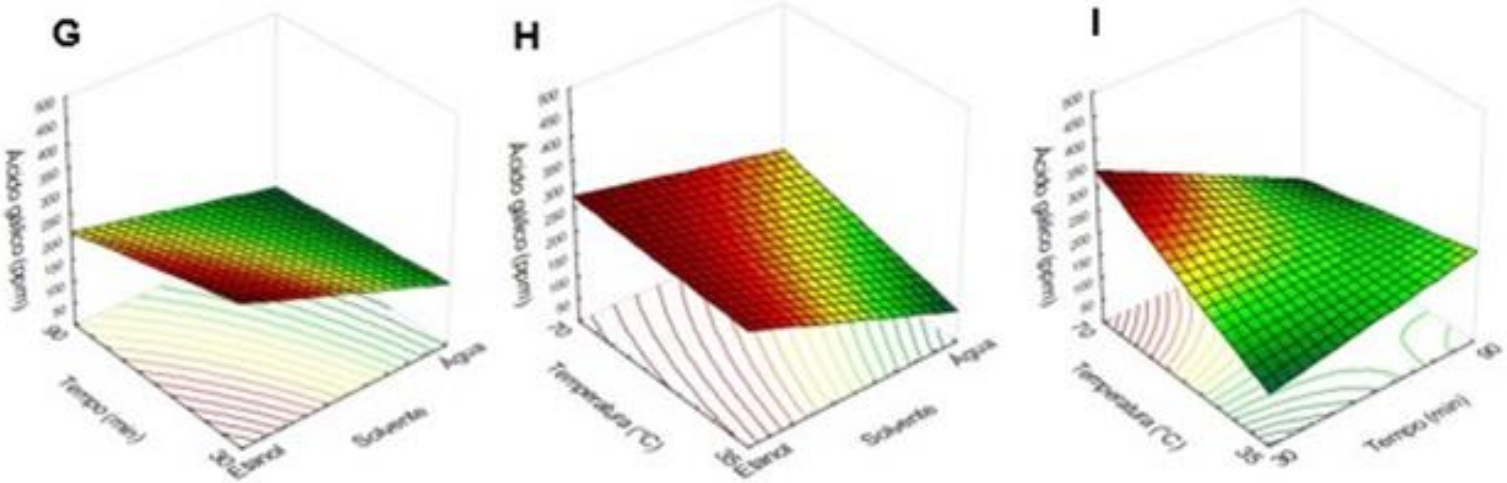

Figura 49 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de ácido gálico obtido por CLAE a partir dos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri.* (G: solvente e tempo; H: solvente e temperatura; I: tempo e temperatura).

Catequina

No resíduo de seiva de *C. lechleri*, a catequina foi extraída em maiores teores (1947 μgg^{-1}) com o uso de etanol, a temperatura de 70 ºC e tempo de 90 minutos. A Figura 50 mostra o gráfico de Pareto, onde os fatores solvente e temperatura, bem como a interação tempo e temperatura foram significativos e positivos.

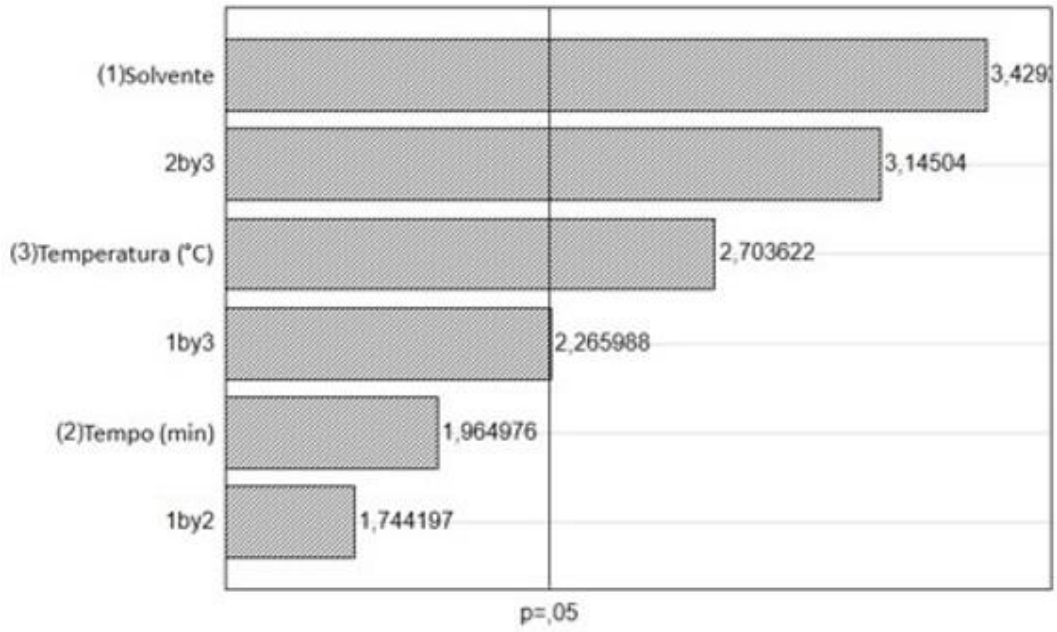

Figura 50 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para catequina por meio de CLAE em extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri.*

Os efeitos positivos do solvente e da temperatura indicam que uma mudança desses fatores de seus menores níveis para níveis maiores acarretaria no aumento do teor de catequina extraída da amostra.

A Equação 21, obtida por regressão linear múltipla levando em consideração os fatores significativos obteve coeficiente de correlação de 0,699, indicando que o modelo matemático se ajusta aos dados experimentais.

$$CATresíduo = 417.78 + 289.82x_1 + 228.50x_1 + 228.50x_3 + 191.51x_1x_3 + 265.81x_2x_3 \quad (Eq.21)$$

A Figura 51 apresenta os gráficos de superfície de resposta obtidos a partir da modelagem matemática que confirma a água como melhor solvente extrator de catequina a partir do resíduo de seiva de *C. lechleri* utilizando temperatura de 70 ºC durante 90 minutos.

As catequinas são de difícil extração, pois podem estar ligadas a açúcares e proteínas. Além disso, a presença de hidroxilas em flavanóis aumenta sua solubilidade em água devida ao maior número de ligações de hidrogênio formadas.

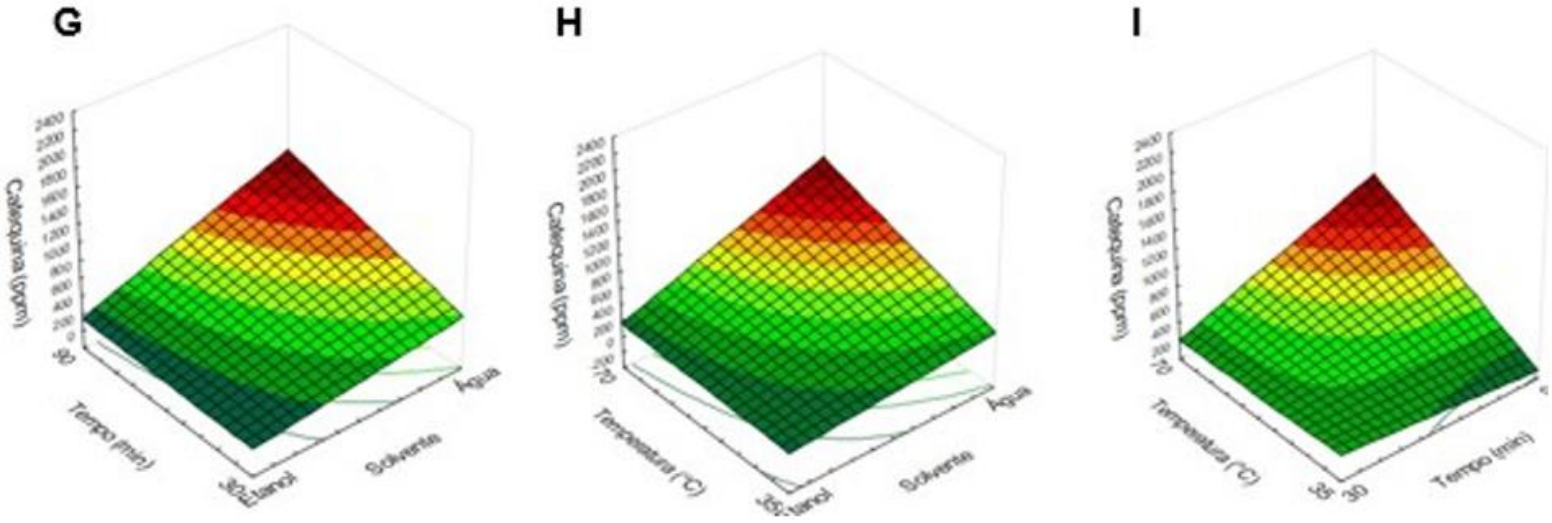

Figura 51 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de ácido gálico obtido por CLAE a partir dos extratos do resíduo de *C. lechleri.* (G solvente e tempo; H: solvente e temperatura; I: tempo e temperatura).

Epicatequina

A epicatequina foi extraída do resíduo de seiva de *C. lechleri* em maior concentração (74,72 $\mu g g^{-1}$) com o uso de água a 70 ºC e 30 minutos de extração. A Figura 52 apresenta o gráfico de Pareto, que mostra que nenhum dos fatores, bem como nenhuma das interações foi significativa nesta análise. Deste modo, os modelos matemáticos não se aplicam aos dados experimentais.

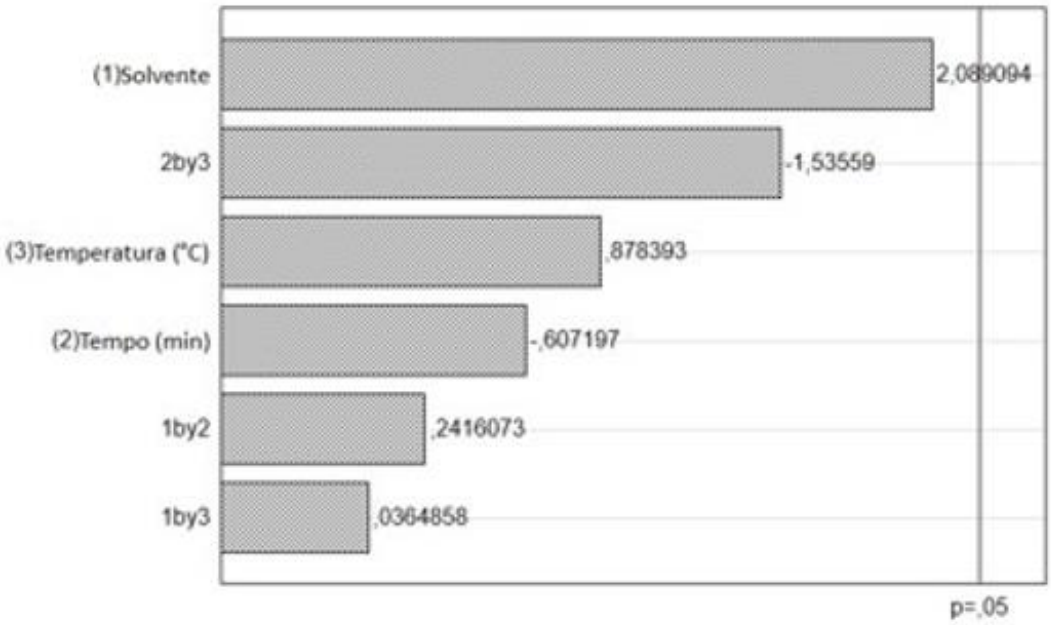

Figura 52 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração de epicatequina por meio de CLAE a partir do extrato do resíduo de seiva de *C. lechleri.*

Ácido Siríngico

O ácido siríngico foi melhor extraído do resíduo de seiva de *C. lechleri* com o uso do solvente água, a 70 ºC e 90 minutos de extração para melhor desprendimento do composto de suas matrizes. O gráfico de Pareto da Figura

53, apresenta todos os fatores e todas as interações como significativos no teor do composto analisado.

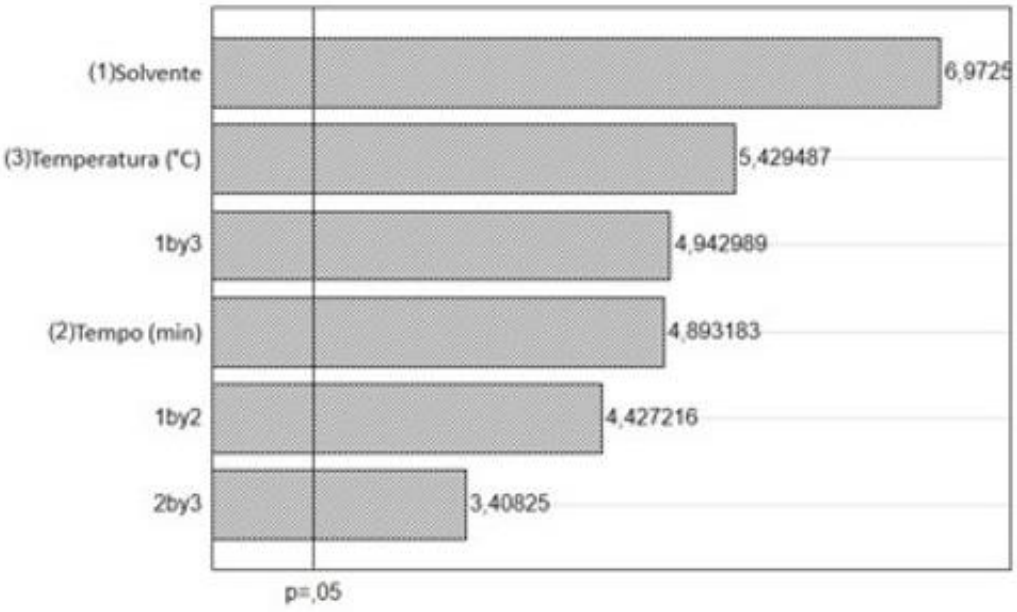

Figura 53 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração de ácido siríngico dos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri* por meio de CLAE.

Os efeitos positivos dos fatores solvente tempo e temperatura indicam que aumentos em seus valores de menores níveis para níveis maiores resultariam no aumento no teor de ácido siríngico obtido.

O modelo gerado por regressão linear múltipla apresentou coeficiente de correlação de 0,946, indicando que os modelos matemáticos se ajustam bem aos dados experimentais.

$$ASresíduo = 40.87 + 15.45\,x_1 + 10.84\,x_2 + 12.03\,x_3 + 9.81\,x_1x_2 + 10.95\,x_1x_3 + 7.55\,x_2x_3 \quad (Eq.22)$$

A partir da modelagem matemática, foram obtidos os gráficos de superfície de resposta apresentados na Figura 54. O ácido siríngico foi melhor extraído do resíduo de seiva de *C. lechleri* quando empregados todos os níveis máximos de extração: água, 90 minutos e 70 ºC.

Assim como ocorreu na extração de ácido siríngico a partir de cascas e folhas de *C. lechleri*, este composto foi extraído em maiores teores a partir do emprego de água como solvente. Da mesma forma como ocorreu na extração do composto da casca e da folha, os oxigênios presentes na molécula, bem como as hidroxilas, conferem maior polaridade ao ácido siríngico, favorecendo sua maior interação com água.

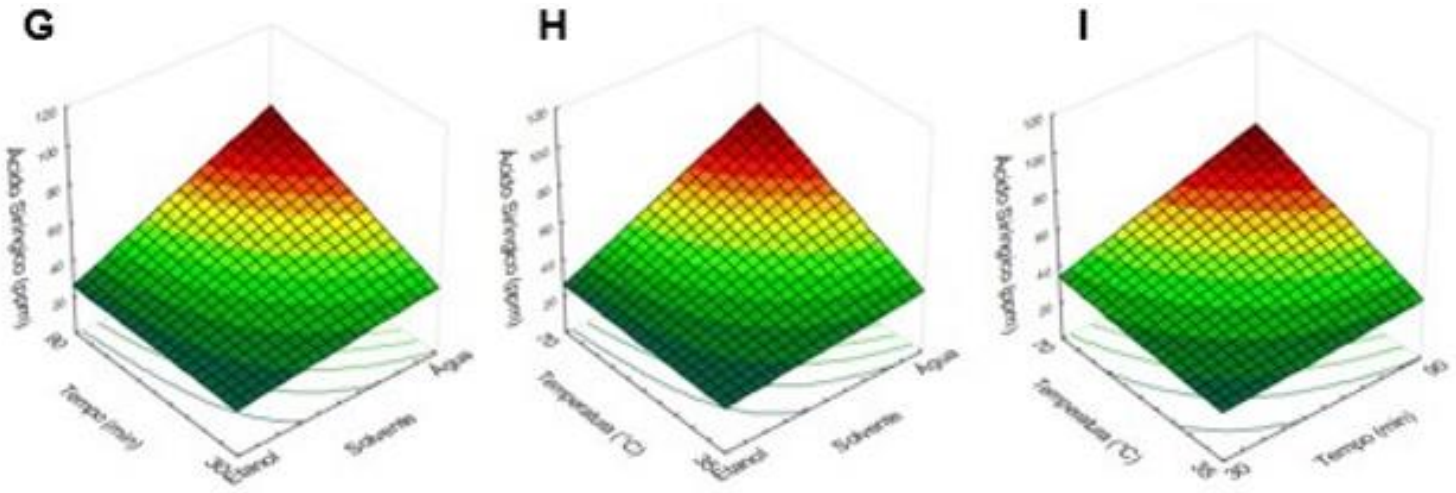

Figura 54 - Gráficos de superfície de resposta para o teor de ácido siríngico obtido por CLAE a partir dos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri.* (G: solvente e tempo; H: solvente e temperatura; I: tempo e temperatura).

A Figura 55 mostra a análise de componentes principais para os dados da análise cromatográfica dos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri.*

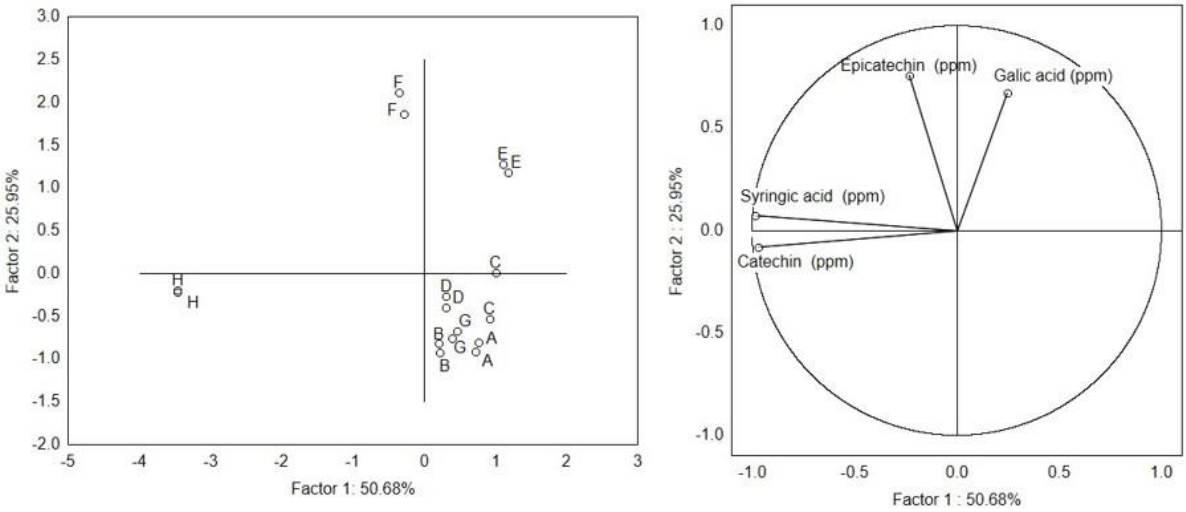

Figura 55 - Análise de componentes principais (PCA) para os dados obtidos através na análise cromatográfica dos extratos de resíduo de seiva de *C. lechleri*. Distribuição das condições de extração no gráfico de escores (esquerda) e distribuição dos compostos isolados no gráfico de pesos (direita).

Conforme mostra a Figura 55, pode ser observado que PC1 explica 50,68% da variância dos dados enquanto PC2 explica 25,95%, somando 76,63% da variância total. Os dados foram agrupados em quatro grupos de similaridade: O primeiro grupo, formado pelas condições de extração A, B, C, D e G apresentou o pior rendimento para todos compostos isolados por CLAE, conforme pode ser visto no quarto quadrante. No primeiro quadrante, pode-se observar que a condição E (etanol, 30 minutos e 70 ºC) obteve melhor rendimento para ácido gálico comparado à outras condições. Epicatequina e ácido siríngico foram melhor extraídos com o emprego de água a 70 ºC durante 30 minutos, conforme mostram suas posições no segundo quadrante (tratamento F). Catequina, apresentou-se como o composto mais estável isolado do resíduo de seiva, resistindo às condições máximas de extração de 70 ºC durante 90 minutos (tratamento H). Além disso, este composto, assim como epicatequina e ácido siríngico, apresentaram maiores rendimentos quando extraídos com água.

O estudo conduzido por Mokrani; Madani (2016), demonstrou que um acréscimo de temperatura de 25°C para 60°C aumentou o rendimento de CFT de 38 para 81 mg QE100g^{-1} (quercetina equivalente por grama de amostra). De acordo com os autores, o aquecimento provavelmente suaviza o tecido da planta, enfraquecendo as interações entre os compostos fenólicos e polissacarídeos e proteínas, permitindo a migração destes compostos para o solvente.

Moreira *et al.* (2017), obtiveram maiores valores de polifenóis extraídos a partir do resíduo de madeira de maçã ao utilizar 55 °C ao invés de 20 °C. Os autores atribuem este aumento ao enfraquecimento na parede celular pelo aumento da temperatura, resultando na melhor interação dos polifenóis com o solvente.

Para Gupta; Bleakley; Gupta, (2007), as diversas espécies do gênero *Croton* apresentam diferentes teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante devido a fatores biológicos e climáticos das diferentes plantas. Na literatura não foram encontrados dados sobre o resíduo da seiva. Contudo, pode-se atribuir os elevados teores de CFT destes à matéria seca da seiva, que apresenta alta relevância biológica, pois, de acordo com Lopes, M. I. L. E. *et al.* (2004), mais de 90 % do peso seco do látex é constituído de compostos fenólicos.

De acordo com Mustafa; Turner (2011) o aumento na temperatura de extração diminui a energia de ativação necessária para iniciar o processo de dessorção entre os compostos bioativos e a amostra. As autoras acrescentam ainda que temperaturas mais altas diminuem a tensão superficial do solvente, solutos e da amostra, além de diminuir a viscosidade do solvente permitindo o melhor alcance deste na matriz da amostra.

Silva et al., (2006) ressaltam que o equilíbrio final entre a concentração e a massa da solução, sendo que o tempo restante depois do equilíbrio não resulta na extração de mais compostos fenólicos. Além disso, os autores observaram uma interação negativa entre temperatura e tempo na extração de flavonoides, atribuído à degradação dos compostos expostos a longa extração em altas temperaturas.

Chiang *et al.* (2017) explicam que apesar de a temperatura de extração ser limitada para a extração de compostos termalmente sensíveis, altas temperaturas são preferíveis para compostos mais estáveis, pois aumentam a difusividade do

soluto e diminuem a barreira de energia. No caso do resíduo de seiva, para a extração dos compostos foi necessário o uso de maior temperatura, indicando que a energia requerida para os extrair da matriz era maior.

Em alguns casos, por outro lado, o uso de altas temperaturas por maior tempo (90 minutos) ocasionou a perda dos compostos fenólicos extraídos. Mokrani & Madani (2016) explicam que o aumento da temperatura na extração de compostos fenólicos acima de certos valores possa promover sua degradação. Maistro *et al.*(2013) estudaram a seiva de *Croton palanostigma* através de CLAE e encontraram a presença de catequinas, taninos e alcaloide taspina em sua pesquisa.

5.4 OUTROS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PARA EXTRATOS DE CASCA, FOLHA E RESÍDUO DE *C. LECHLERI*

Os extratos obtidos das amostras de casca, folha e resíduo de *C. lechleri* tiveram sua atividade antioxidante determinada por outros métodos padronizados, devido às distintas formas que os compostos com capacidade antioxidante podem atuar através da captura de radicais livres por meio da transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio (CANABADY-ROCHELLE et al., 2015). De modo a obterem-se meios de comparação com os dados obtidos na literatura, a atividade antioxidante dos extratos obtidos das amostras de casca, folha e resíduo de seiva de *C. lechleri* foi determinada pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH e ABTS por meio de curva de Trolox, sequestro do radical DPPH por meio de curva cinética e poder de redução do ferro (FRAP). A Tabela 14 mostra os valores obtidos de atividade antioxidante para os extratos das amostras em cada metodologia utilizada.

Tabela 14 - Valores de EC_{50}, FRAP, ABTS e DPPH para as amostras de casca, folha e resíduo de *C. lechleri.*

Amostra	DPPH TEAC (µmol Troloxg^{-1})	DPPH EC_{50} (mgmL^{-1})	FRAP (µmol Fe^{2+} g^{-1})	ABTS TEAC (µmol Troloxg^{-1})
Casca	281,45 ± 0,86 [a]	0,05 [c]	1702,89 ± 53,91 [b]	446,92 ± 0,45 [a]
Folha	46,67 ± 0,11 [b]	5,14 [a]	318,48 ± 31,74 [c]	446,15 ± 0,45 [a]
Resíduo	19,91 ± 2,0 [c]	0,32 [b]	10228,06 ± 386,02 [a]	445,63 ± 0,90 [a]

Médias ± desvio padrão; médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Entre as amostras testadas em diferentes métodos analíticos, casca a resíduo apresentaram-se como as matrizes de maior atividade, seguidos pela folha. Enquanto para o método DPPH TEAC e EC_{50} o extrato da casca apresentou os maiores valores de AA. Para o método FRAP o maior valor de AA foi determinado com o extrato do resíduo de seiva, enquanto que na metodologia de ABTS TEAC não houve diferença estatística significativa entre as amostras. Os valores distintos nos métodos podem ser atribuídos às diferentes maneiras como cada composto antioxidante age frente aos radicais são gerados nos ensaios.

A Figura 56 mostra que, quanto menor o valor de EC_{50}, maior a atividade antioxidante do extrato. No método para determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) uma curva de sulfato ferroso é empregada como curva padrão para comparação ao extrato analisado.

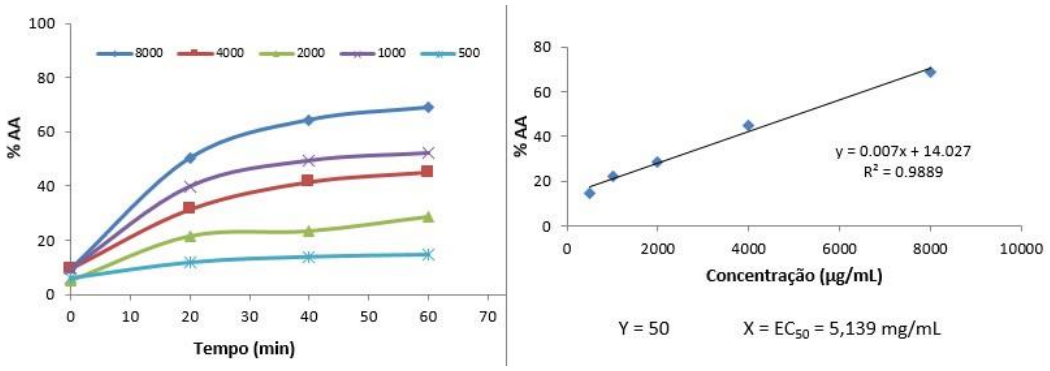

Figura 56 - Curva cinética utilizada para a determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH EC_{50}.

Rossi *et al.* (2011) determinaram a atividade antioxidante de óleo essencial da casca de *C. lechleri* pelo método DPPH obtendo 15,28 mg mL^{-1}. van Vuuren; Viljoen (2008), encontraram valor de 112,8 mg mL^{-1} utilizando o mesmo método para determinar a AA na folha de *Croton sylvaticus*, enquanto Ndunda (2014) utilizou a casca desta espécie de planta e obteve valores de EC_{50} maiores que 1000 mg mL^{-1}. Em outras espécies da família *Euphorbiaceae*, Sofidiya *et al.* (2015), obtiveram valores de 101,6 µmol $Fe^{2+}g^{-1}$ utilizando a metodologia FRAP para determinar a atividade antioxidante do extrato etanólico da casca de *Margaritaria discoidea*. Ben Jannet *et al.* (2017) obtiveram valores de EC_{50} de 5,25 e 4,90 $mgmL^{-1}$, respectivamente, usando a fração polar de espécies de *Euphorbia paralias* e *Euphorbia terracina* originárias da Tunísia. A atividade antioxidante de *Euphorbia caducifolia, Euphorbia hirta* e *Phyllanthus fraternus* originárias do Paquistão foram determinadas pelo método FRAP por Qasim *et al.* (2017), que obtiveram valores de 910, 1.530 e 1.580 µmol $Fe^{2+}.g^{-1}$, respectivamente. Os valores obtidos por Dzoyem; Eloff (2015) a partir dos extratos cetônicos de *Alchornea laxiflora* e *Jatropha curcas* da África do Sul variaram de 438,42 a 68,17 µmol $Fe^{2+}.g^{-1}$, respectivamente.

Os diversos resultados encontrados para os valores de atividade antioxidante para extratos de plantas do gênero *Croton* e outras espécies da família *Euphorbiaceae,* em comparação com *Croton lechleri,* são explicados pelos diferentes métodos de extração, solventes utilizados, compostos bioativos presentes em cada espécie e condições ambientais, como mostram estudos realizados por (Alberti *et al.*, 2014).

5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As melhores condições de extração dos extratos de casca, folha e resíduo de seiva em relação à atividade antioxidante forem testadas contra os microrganismos Gram-positivos *Staphylococcus aureus* e *B. subitilis,* Gram-negativos *Salmonella bongori, Salmonella thyphimurium* e *Eschirichia coli,* além

da levedura *C. albicans*. A Figura 57 mostra o resultado da determinação da concentração inibitória mínima e como foram organizados o meio de cultura, extratos e controles para os bioensaios.

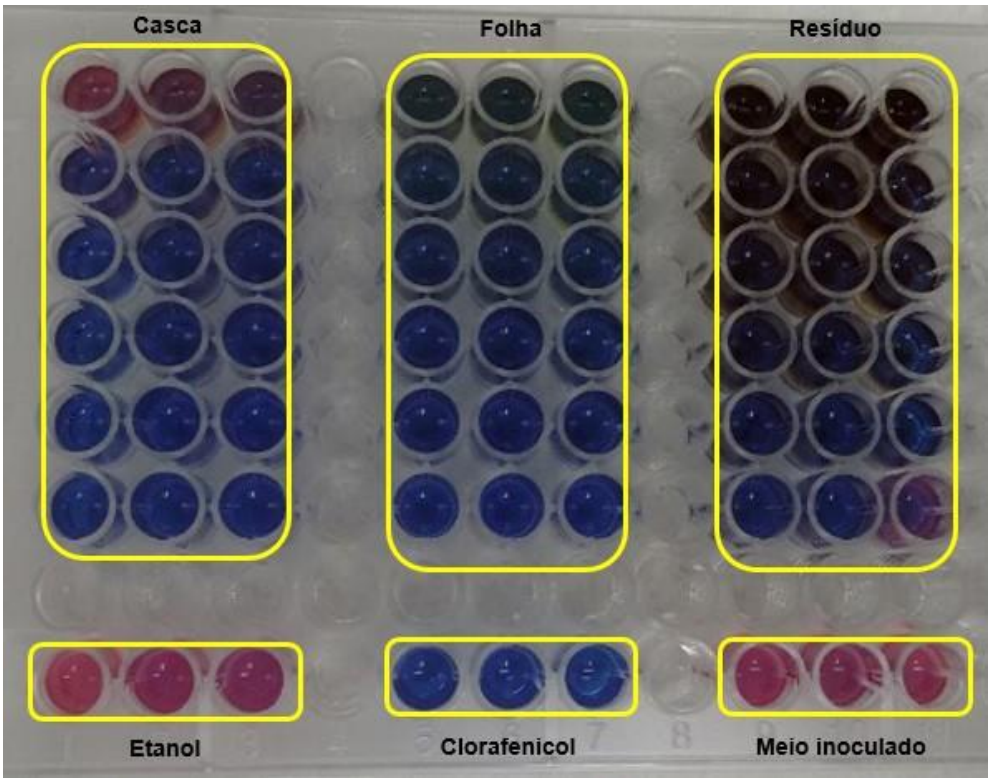

Figura 57 - Placa de 96 revelada com clorafenicol mostrando o esquema de como foram dispostos extratos e controles.

A Tabela 15 mostra os valores de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima para os extratos testados. Os extratos de casca, folha e resíduo de serva de *C. lechleri* apresentaram resultados semelhantes quando testados contra os microrganismos, obtendo forte atividade contra *S. aureus* e as duas espécies de *Salmonella* (os valores de CIM variaram entre 0,002 e 0,005 mg mL^{-1}). Os três extratos também foram capazes de inibir o desenvolvimento da levedura *C. albicans* na concentração de 0,156 mg mL^{-1}. Contudo, não houveram resultados positivos na determinação da concentração bactericida mínima contra os microrganismos Gram-Positivos, com exceção para *Salmonella thyphimurium* testada com o resíduo de seiva. *E. coli* e *B. subitilis* não

foram inibidas pelos extratos de casca, folha e resíduos de *C. lechleri*. nas concentrações estudadas.

Tabela 15 - Valores de CIM* e CBM para os microrganismos testados com os extratos obtidos com as amostras de casa, folha e resíduo de *C. lechleri.*

	Casca		Folha		Resíduo	
Microrganismo	**CIM (mg mL^{-1})**	**CBM (mg mL^{-1})**	**CIM (mg mL^{-1})**	**CBM (mg mL^{-1})**	**CIM (mgmL^{-1})**	**CBM (mgmL^{-1})**
Staphylococcus aureus ATCC 25923	0,002	>5,00	0,005	> 5,00	0,002	>5,00
Bacillus subtilis ATCC 19659	>5,00	>5,00	> 5,00	> 5,00	>5,00	>5,00
Escherichia coli ATCC 25922	>5,00	>5,00	> 5,00	> 5,00	>5,00	>5,00
Salmonella bongori ATCC 43975	0,002	>5,00	0,005	> 5,00	0,002	>5,00
Salmonella typhimurium ATCC 0028	0,002	>5,00	0,005	> 5,00	0,002	0,625
Candida albicans ATCC 118804	0,156	>5,00	0,156	> 5,00	0,156	>5,00

*CIM=Concentração inibitória mínima; CBM=Concentração bactericida/fungicida mínima.

Rossi *et al.(*2011) obteve valores de 0,10 mg mL^{-1} para E. coli e 10,10 mg mL^{-1} para *S. aureus* utilizando o óleo essencial da casca de *C. lechleri*. Van Vuuren; Viljoen (2008) apresentou valores de CIM de 2,0, 2,3 e 6,0 mg mL^{-1} para *S. aureus, E. coli* e *C. albicans*, respectivamente, com os extratos da folha de *Croton gratissimus*. Os mesmos autores testaram extratos da casca de *C. gratissimus* obtendo 0,6, 4,0 e 6,0 mgmL^{-1} para os mesmos microrganismos. Ndunda (2014) testou o extrato metanólico da casca de *Croton sylvaticus* em maiores concentrações e determinou 10 mg mL^{-1} para inibir o crescimento de *B. subtillis,* enquanto Selowa et al. (2010) obteve CIM de 1,25 mg mL^{-1} com as folhas da mesma espécie contra *S. aureus* e *E. coli.* Mokoka et al. (2010) também testou o extrato de folha de *C. sylvaticus*, apresentando CIM de 0,07 mg mL^{-1}.

Embora a maioria dos compostos com atividade antimicrobiana apresente maior atividade contra as bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas (devido à superfície da membrana hidrofílica de lipopolissacarídeos das Gram-negativas), os extratos de casca, folha e resíduo de seiva de *C. lechleri* não apresentaram diferenças quanto à inibição entre estes microrganismos. Esta

propriedade pode ser atribuída ao efeito que os extratos brutos obtidos de plantas fornecem devido à presença de mais de um composto que podem exercer efeito sinérgico Ćavar et al. (2012).

Bilal *et al.* (2017), explicam que existem vários tipos de mecanismos antimicrobianos e que provavelmente a ação dos extratos de plantas contra agentes microbianos seja resultado de uma combinação destes, como decomposição da membrana citoplasmática, coagulação de partes interiores da célula, depósito de proteínas na membrana, entre outros. Ainda, os autores afirmam que os compostos fenólicos também agem como agentes antimicrobianos através da ligação de quelante de metal e adesão e complexação de parede celular. Ghimire; Yu; Chung (2017), enfatizam o poder dos compostos fenólicos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas através da capacidade de inativar a adesão microbiana, a interrupção das membranas microbianas, diminuindo a produção de ATP e a degradação da parede celular das bactérias.

6 CONCLUSÃO

Os dados deste trabalho mostraram que os extratos aquosos de casca, folha e resíduo de seiva de *Croton lechleri* possuem altos teores de compostos fenólicos, especialmente ácido gálico, catequina, epicatequina e ácido siríngico. Os extratos o etanólicos apresentaram atividades antioxidantes e antimicrobianas relevantes, provando a eficácia do uso popular da planta. Deste modo, a melhor condição de extração de compostos fenólicos foi a água, a 70 ºC por 30 min, enquanto que para os compostos com atividade antioxidante foi etanol, a 70 ºC por 90 min.

A diversidade da composição fenólica presentes nos diferentes extratos de cascas, folhas e resíduo de *C. lechleri* pode explicar os diferentes resultados entre as atividades antimicrobianas e antioxidantes determinadas neste trabalho.

A partir dos resultados de ANOVA, Pareto e gráficos de superfície, pode-se estabelecer as melhores condições de extração para a casca e folha de *C. lechleri* para temperatura de 70 ºC, solvente extrator como etanol e tempo de extração de 30 minutos.

Além disso, o delineamento fatorial permitiu a redução do número de ensaios realizados sem diminuir a qualidade da informação. Metodologia de superfície de resposta e análise de componentes principais empregados nesta pesquisa provaram ser ferramentas eficientes para análise de dados.

No entanto, os estudos de extração e determinação dos compostos bioativos e atividades biológicas dos extratos brutos são os primeiros passos para o estudo de plantas medicinais. Pesquisas adicionais serão necessárias para uma melhor avaliação desta espécie da família *Euphorbiaceae*. Os próximos passos para dar continuidade a esta pesquisa incluem o fraccionamento, o isolamento, a purificação e a determinação de doses seguras de extratos brutos ou purificados.

REFERÊNCIAS

ACHKAR, M. T.; NOVAES, G. M.; SILVA, M. J. D.; VILEGAS, W. Propriedade Antioxidante de Compostos Fenólicos: Importância na Dieta e na Conservação de Alimentos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 11, n. 2, p. 398–406, 2013.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, 2013.

ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; ZARDO, D. M.; et al. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 149, p. 151–158, 2014.

ALI, Y.; ALAM, M. S.; HAMID, H.; et al. Attenuation of inflammatory mediators, oxidative stress and toxic risk evaluation of Aporosa lindleyana Baill bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1513–1521, 2014.

ALONSO-CASTRO, A. J.; ORTIZ-SÁNCHEZ, E.; DOMÍNGUEZ, F.; et al. Antitumor effect of Croton lechleri Mull. Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 438–442, 2012.

ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 785–788, 2009.

ALVES, C. Q.; QUÍMICA, I. DE; FEDERAL, U.; et al. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO EM SUBSTRATOS ORGÂNICOS. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.

AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.

AMINI, A.; LIU, M.; AHMAD, Z. Understanding the link between antimicrobial properties of dietary olive phenolics and bacterial ATP synthase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 153–164, 2017.

ANVISA. **Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira.** , p. 1–126, 2011.

BECERRA-HERRERA, M.; VÉLEZ-MARTÍN, A.; RAMOS-MERCHANTE, A.; et al. Characterization and evaluation of phenolic profiles and color as potential discriminating features among Spanish extra virgin olive oils with protected designation of origin. **Food Chemistry**, v. 241, n. September 2017, p. 328–337, 2018.

BILAL, M.; RASHEED, T.; IQBAL, H. M. N.; et al. Macromolecular agents with antimicrobial potentialities: A drive to combat antimicrobial resistance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 554–574, 2017.

CAI, Y.; EVANS, F. J.; ROBERTS, M. F.; et al. Polyphenolic compounds from Croton lechleri. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 2033–2040, 1991.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHQAIR, N. S. M. S. A.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v. 5, n. 11, p. 26–32, 2007.

ĆAVAR, S.; MAKSIMOVIĆ, M.; VIDIC, D.; PARIĆ, A. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of Artemisia annua L. from Bosnia. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 479–485, 2012.

CHIANG, P. S.; LEE, D. J.; G. WHITELEY, C.; HUANG, C. Y. Antioxidant phenolic compounds from Pinus morrisconicola using compressional-puffing pretreatment and water–ethanol extraction: Optimization of extraction parameters. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 70, p. 7–14, 2017.

CORDEIRO, K. W.; FELIPE, J. L.; MALANGE, K. F.; et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Croton urucurana Baillon bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p. 128–135, 2016.

DESMARCHELIER, C.; SCHAUS, F. W.; CICCA, G. Effects of Sangre de Drago from Croton lechleri Muell -Arg on the production of active oxygen radicals, **Journal of Ethnopharmacology** , v. 58, p. 103–108, 1997.

DURGA, M.; NATHIYA, S.; DEVASENA, T. Multifarious actions of dietary flavonoids - Implications in cancer and cataract. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 5, n. 2, p. 404–416, 2014.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

DUTTA, S.; DEY, P.; CHAUDHURI, T. K. Assessment of bioactive phytochemicals present in the root of croton bonplandianum available in the sub-Himalayan region of West Bengal. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. SUPPL.4, p. 540–545, 2013.

DZOYEM, J. P.; ELOFF, J. N. Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, p. 194–201, 2015.

FÃO, F.; ZAN, R. A.; BRONDANI, F. M. M.; RAMOS, L. J.; MENEGUETTI, D. U. DE O. Análise do Potencial Mutagênico da Seiva da Casca de Croton lechleri (Mull. Arg), no Estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 1, p. 91–98, 2012.

FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patólogicas. **Rev. Nutr.**, v. 11, n. 1, p. 3–14, 1998.

FIRMO, W. D. C. A.; MENEZES, V. A. M. DE; PASSOS, C. E. D. C.; et al. Contexto histórico, uso porpular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.**, v. 18, n. n. especial, p. 90–95, 2011.

FLOEGEL, A.; KIM, D. O.; CHUNG, S. J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043–1048, 2011.

GHIMIRE, B. K.; YU, C. Y.; CHUNG, I. M. Assessment of the phenolic profile, antimicrobial activity and oxidative stability of transgenic Perilla frutescens L.overexpressing tocopherol methyltransferase (γ-tmt) gene. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 77–87, 2017.

GUPTA, D.; BLEAKLEY, B.; GUPTA, R. K. Dragon’s blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 3, p. 361–380, 2007.

HWANG, O. Role of Oxidative Stress in Parkinson’s Disease. **Experimental**

Neurobiology, v. 22, n. 1, p. 11, 2013.

BEN JANNET, S.; HYMERY, N.; BOURGOU, S.; et al. Antioxidant and selective anticancer activities of two Euphorbia species in human acute myeloid leukemia. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 90, p. 375–385, 2017.

JONES, K. Review of *Sangre de Drago* (*Croton lechleri*) - A South American Tree Sap in the Treatment of Diarrhea, Inflammation, Insect Bites, Viral Infections, and Wounds: Traditional Uses to Clinical Research. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 9, n. 6, p. 877–896, 2003.

JUNIOR, V. F. DA V. Study of the medicinal plants consumption in the Middle-North Region of the Rio de Janeiro State : Acceptance by health professionals , way of use of the population. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 8(2), n. September, p. 308–313, 2008.

KUMAR, S.; SINGH, A.; KUMAR, B. Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of Phyllanthus species by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 4, p. 214–222, 2017.

LOPES, M. I. L. E.; SAFFI, J.; ECHEVERRIGARAY, S.; HENRIQUES, J. A. P.; SALVADOR, M. Mutagenic and antioxidant activities of Croton lechleri sap in biological systems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2–3, p. 437–445, 2004.

LOPES, T. V.; FÉLIX, S. R.; SCHONS, S. DE V.; NOBRE, M. DE O. Dragon's blood (Croton lechleri Mull., Arg.): an update on the chemical composition and medical applications of this natural plant extract. A review. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 7, n. 2, p. 167–191, 2013.

MAISTRO, E. L.; GANTHOUS, G.; MACHADO, M. D. S.; et al. Dragon's blood Croton palanostigma induces genotoxic effects in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 406–411, 2013.

MILENE ANGELO, P.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (Prunus persica L.) fruit. **Separation and Purification Technology,** v. 162, p. 68-76,

2016.

MONTOPOLI, M.; BERTIN, R.; CHEN, Z.; et al. Croton lechleri sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 747–753, 2012.

MOREIRA, M. M.; BARROSO, M. F.; BOEYKENS, A.; et al. Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 104, n. April, p. 210–220, 2017.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 1, p. 8–18, 2011.

N. I. MOHD ALI,. Phytochemical screening, antioxidant and analgesic activities of Croton argyratus ethanolic extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 21, p. 3724–3731, 2012.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 5, p. 1523–1542, 2006.

NASCIMENTO, A. M.; MARIA-FERREIRA, D.; DAL LIN, F. T.; et al. Phytochemical analysis and anti-inflammatory evaluation of compounds from an aqueous extract of Croton cajucara Benth. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 145, p. 821–830, 2017.

NICOLINI, P.; NASCIMENTO, J. W. L.; GRECO, K. V.; MENEZES, F. G. DE. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. suppl, p. 689–696, 2008.

NOVAES, C. G.; ROMÃO, I. L. DA S.; SANTOS, B. G.; et al. Screening of Passiflora L. mineral content using principal component analysis and Kohonen self-organizing maps. **Food Chemistry**, v. 233, p. 507–513, 2017.

OLIVEIRA, A. C. DE; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

DE OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ??cidos fen??licos. **Quimica Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.

PENNA FILHO, P. Reflexões sobre o Brasil e os desafios Pan-Amazônicos. **Revista Brasileira de Política Internacional**, v. 56, n. 2, p. 94–111, 2013.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000.

QASIM, M.; ABIDEEN, Z.; ADNAN, M. Y.; et al. Antioxidant properties, phenolic composition, bioactive compounds and nutritive value of medicinal halophytes commonly used as herbal teas. **South African Journal of Botany**, v. 110, p. 240–250, 2017. South African Association of Botanists.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quimica Nova**, v. 29, n. 4, p. 755–760, 2006.

RAMÍREZ, L. C.; CASTAÑEDA, A. C.; VARGAS, A. M. Evaluación del potencial antibacterial in vitro de Croton lechleri frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. **Ciencias Biomédicas**, v. 11, n. 19, p. 51–63, 2013.

ROCKENBACH, I. I. .; SILVA, G. L. DA; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M. .; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (Vitis vinifera) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2600, p. 238–244, 2008.

ROSSI, D.; GUERRINI, A.; MAIETTI, S.; et al. Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador Croton lechleri Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 837–848, 2011.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. DE; et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). **Comunicado técnico**, v. 125, p. 1–4, 2006.

SALAR, R. K.; PUREWAL, S. S.; BHATTI, M. S. Optimization of extraction conditions and enhancement of phenolic content and antioxidant activity of pearl millet fermented with Aspergillus awamori MTCC-548. **Resource-Efficient**

Technologies, v. 2, n. 3, p. 148–157, 2016.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K. M.; YOGA LATHA, L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2011.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1012–1018, 2006.

DA SILVA PORT'S, P.; CHISTÉ, R. C.; GODOY, H. T.; PRADO, M. A. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 875–881, 2013.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., & LAMUELA-RAVENTOS, R. M. . Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 152–178., 1999.

SISODIA, S.; SIDDIQUI, M. B. Allelopathic effect by aqueous extracts of different parts of Croton bonplandianum Baill . on some crop and weed plants. **Development**, v. 2, n. 1, p. 022–028, 2010.

SKENDI, A.; IRAKLI, M.; CHATZOPOULOU, P. Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 6, p. 62–69, 2017.

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos Como Antioxidantes. **Revista de Nutricao**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOFIDIYA, M. O.; ORISAREMI, C. O.; SANSALIYU, I.; ADETUNDE, T. O. Gastroprotective and antioxidant potentials of ethanolic stem bark extract of Margaritaria discoidea (Euphorbiaceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 240–246, 2015.

VÁSQUEZ, S. P. F.; MENDONÇA, M. S. DE; NODA, S. DO N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 4, p. 457–472, 2014.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura?

Quimica Nova, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.
VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M. In vitro evidence of phyto-synergy for plant part combinations of Croton gratissimus (Euphorbiaceae) used in African traditional healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 700–704, 2008.

WANG, X.; WANG, W.; LI, L.; et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 8, p. 1240–1247, 2014.

WANGENSTEEN, H.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. S. Medicinal plants from Mali: Chemistry and biology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 429–437, 2015.

YOGENDRA KUMAR, M. S.; TIRPUDE, R. J.; MAHESHWARI, D. T.; BANSAL, A.; MISRA, K. Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (Hippophae rhamnoides L.) leaves in vitro. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3443–3450, 2013.

ZEVEDO, PAULA, A. DE; GUIDORIZZI, S.; PACHECO, A.; BIONI, C.; TELES, G. Efeito leishmanicida in vitro do látex de Croton lechleri (Euphorbiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 3, p. 413–418, 2015.

ANEXOS

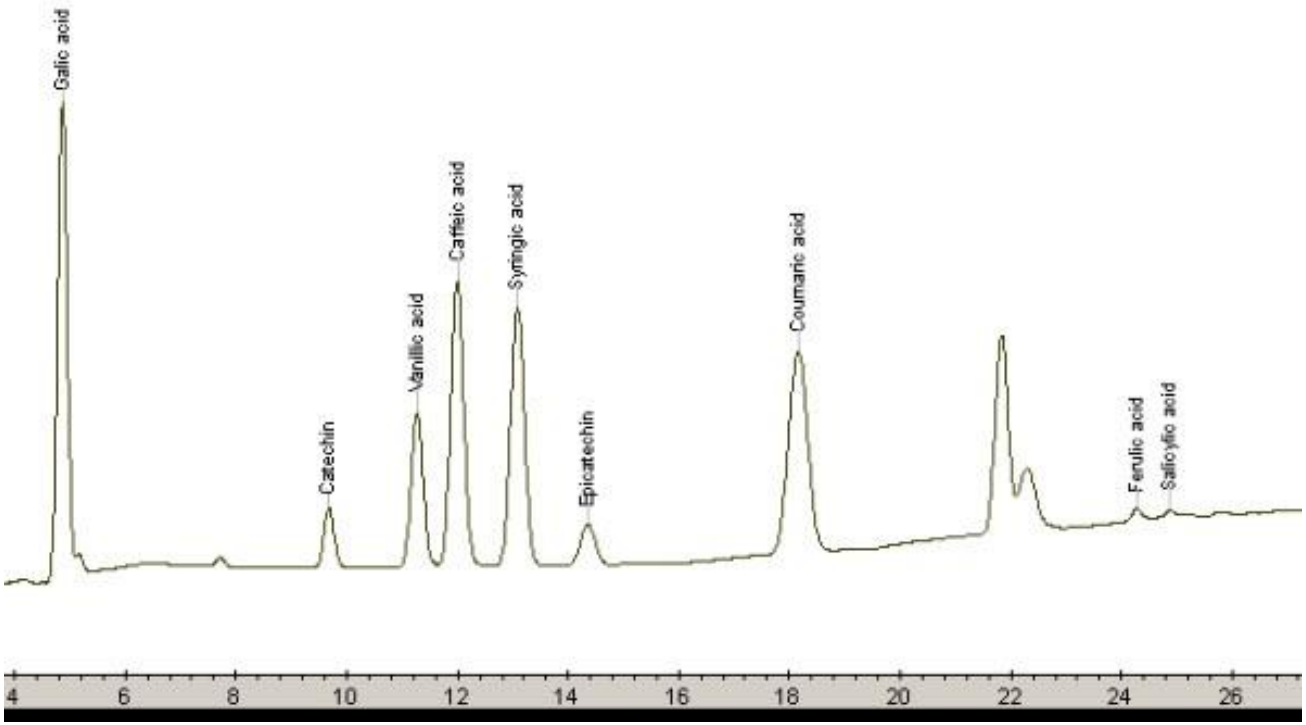

Figura 58 - Cromatograma do mix de padrões de compostos fenólicos usados para comparação.

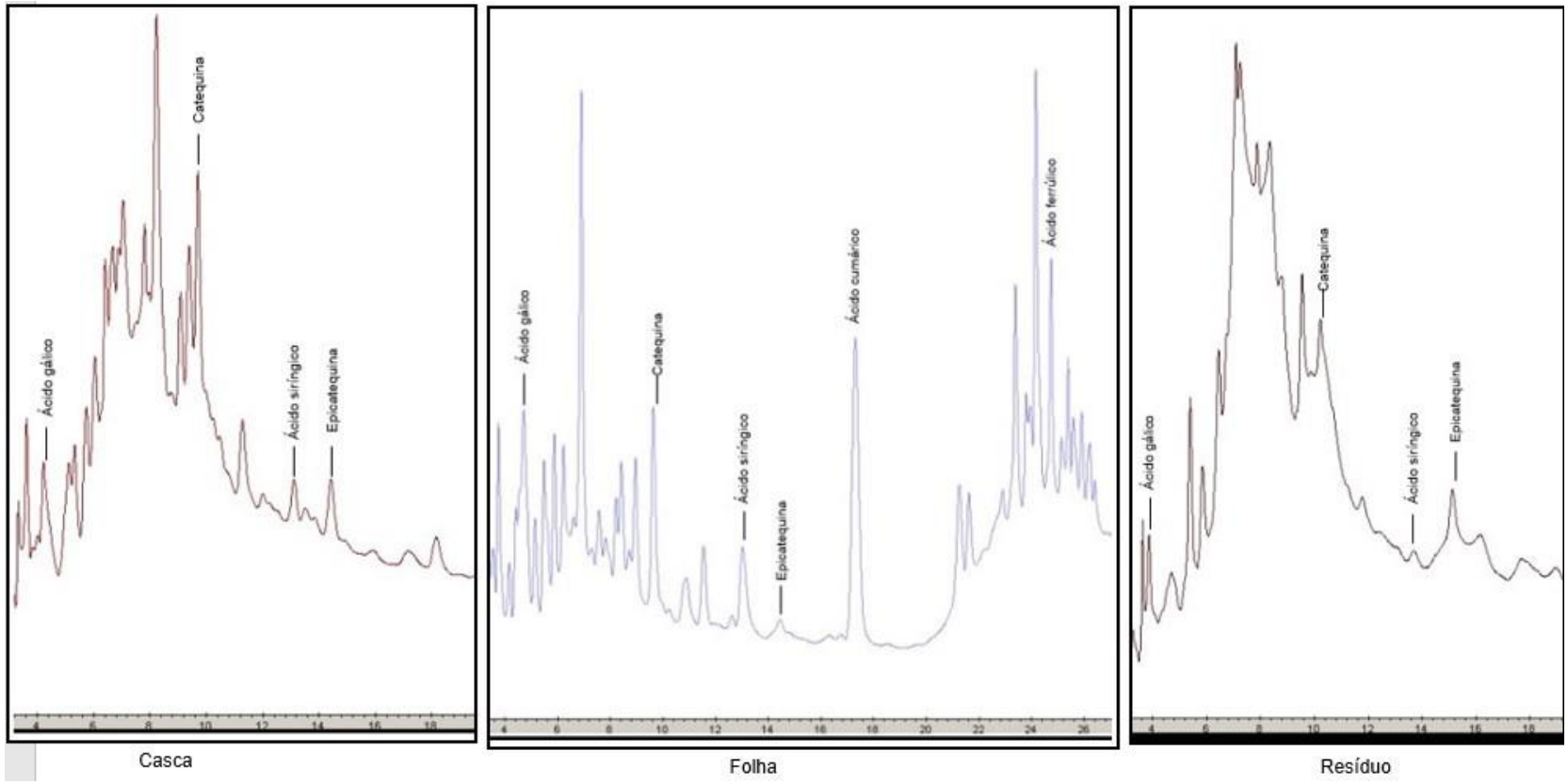

Figura 59 - Cromatogramas dos extratos da casca, folha e resíduo de *C. lechleri.*