



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA - ITEC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA QUÍMICA -
PPGEQ

CINTYA CORDOVIL RODRIGUES

**ESTUDO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO DOS POLIFENÓIS
TOTAIS, AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DA CASCA DO CAULE DE *Croton palanostigma* KLOTZSCH.**

BELÉM

2017

CINTYA CORDOVIL RODRIGUES

**ESTUDO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO DOS POLIFENÓIS
TOTAIS, AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DA CASCA DO CAULE DE *Croton palanostigma* KLOTZSCH.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

ORIENTADOR: Dr. Davi do Socorro Barros Brasil
CO-ORIENTADOR: Dr. Lênio José Guerreiro de Faria

BELÉM

2017

CINTYA CORDOVID RODRIGUES

**ESTUDO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO DOS POLIFENÓIS
TOTAIS, AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBINA
DA CASCA DO CAULE DE *Croton palanostigma* KLOTZSCH.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

DATA DA AVALIAÇÃO: 22 / 02 / 2017
CONCEITO: APROVADA

BANCA EXAMINADORA


Dr. Davi do Socorro Barros Brasil
(PPGEQ/ ITEC / UFPA / Orientador)


Dr. Lênio José Guerreiro de Faria
(PPGEQ/ ITEC / UFPA / Co-orientador)


Dr. Nielson Fernando da Paixão Ribeiro
(PPGEQ/ ITEC / UFPA)


Dr. Maria Fani Dolabela
(PPGCF/ ICS / UFPA)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Rodrigues, Cintya Cordovil, 1982-

Estudo de métodos de extração, quantificação dos polifenóis totais, avaliação das atividades antioxidantes e antimicrobianas da casca do caule de *Croton palanostigma* Klotzsch/Cintya Cordovil Rodrigues.- 2017.

Orientador: Davi do Socorro Barros Brasil,

Coorientador: Lênio José Guerreiro de Faria

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará. Instituto de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Belém, 2017

1. Croton (Botânica) 2. Plantas medicinais
3. Antioxidantes 4. Fenóis I. Título

CDD 22.ed.583.69

Dedico este trabalho à uma pessoinha que, em tão pouco tempo, transformou e renovou minha vida, me dando um folego novo para sonhar e forças para alcançar meus objetivos, minha querida e amada filha **Olga Francine Veiga Cordovil de Souza.**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a **Deus Pai**, por nunca me desamparar, por me mostrar uma janela quando uma porta se fechava, por transformar cada dificuldade em vitória, pela oportunidade de concluir este trabalho que, com tão grande esforço, chegou ao fim e por saber que sou a menina de Teus olhos e que Tu nunca me abandonarás.

Ao meu amado marido **Cleber Francisco Quaresma de Souza**, que sempre esteve ao meu lado me dando forças pra continuar, me acompanhando em todos os momentos, me ajudando ativamente na conclusão de meus experimentos de forma tão responsável, além cuidar de mim de forma tão amorosa.

À minha filha linda **Olga Francine Veiga Cordovil de Souza**, que chegou em minha vida para me dar um incentivo a mais em correr atrás de meus objetivos. Além de me mostrar o real significado da palavra amor.

À minha mãe **Maria da Veiga Cordovil**, por seu amor incondicional, educação, lição de vida e incentivo. Sempre me dizendo não só o que eu queria ouvir, mas também o que eu precisava escutar.

Ao meu irmão **Eduardo Cordovil** e meu sobrinho **Allyson Eduardo**, pelo amor e incentivo incondicional.

Ao meu primo **Ramon da Veiga**, por me mostrar que a fé não tem limites, que o amor salva e que a família é primordial. Ele me mostrou que lutar sempre é a melhor alternativa e que se às vezes esmorecemos, é porque quando somos fracos aí é que nos mostramos mais fortes ainda e que o impossível é apenas umas das especialidades de Deus, obrigada por me ensinar o valor da vida!

A minha **Grande Família** que igual não tem, sempre presente e atuante seja nos momentos bons quanto nos difíceis.

Ao **Prof. Dr. Davi do Socorro B. Brasil**, o qual me deu a oportunidade de absorver seus conhecimentos, pela paciência e imensa ajuda em todos os momentos, além da confiança em meu trabalho.

Ao **Prof. Dr. Lênio José Guerreiro de Faria** pela sua co-orientação e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo e grande colaborador **Alexandre Augusto Moraes de Souza**, sua ajuda foi de grande importância para a conclusão deste trabalho, sempre presente e pronto para auxiliar em tudo que eu precisasse.

A amiga que fiz **Dayse Lúcia do Nascimento Brandão**, que foi de grande importância no desenvolvimento deste trabalho.

A **Elza Brandão** pelos conhecimentos transmitidos foi de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho.

A **Rafaela Pinheiro** e **Samara Menezes** pela contribuição em análises no Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais – LEPRON e no Laboratório de Espectrometria.

A **Leia, Shirley** e **Natale** pela grande ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Ao grande amigo **Luiz Felipe Pereira** pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório **Leticia Siqueira, Amanda Bruna, Fábio Bruno, Melina Murata, Alefhe Cordovil** e **Nayara Maria**.

As minhas amigas **Bruna Lopes** em companhia com a “**Maria Antonia**” e **Joseane Gonçalves** em companhia com o “**Pietro**”, pela amizade, incentivo, risadas e comilanças.

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	OBJETIVOS	19
2.2.	Objetivo Geral	19
2.3.	Objetivos Específicos	19
3.	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1.	Considerações sobre <i>Croton</i>	20
3.2.	Processo de extração de produtos naturais	24
3.3.	Planejamento de Experimento	32
3.3.1.	Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)	33
3.3.2.	Função Desejabilidade	34
3.4.	Métodos de caracterização dos extratos	35
3.4.1.	Espectroscopia no Infravermelho	35
3.5.	Compostos Fenólicos	35
3.6.	Atividade Antioxidante	37
3.7.	Atividade Antimicrobiana	38
4.	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1.	Material	41
4.1.1.	Coleta e processamento do material vegetal e processamento do método	41
4.1.2.	Solventes e reagentes	42
4.2.	Métodos	42
4.2.1.	Determinação da Umidade residual	42
4.2.2.	Análise Granulométrica	43
4.2.3.	Análise por Infravermelho	43
4.2.4.	Planejamento Experimental da Extração	43
4.2.4.1.	Extração Convencional	43
4.2.4.2.	Extração com CO ₂ supercrítico	44
4.2.5.	Processo de Extração	45
4.2.5.1.	Extração convencional	45
4.2.5.2.	Extração com fluido supercrítico	47
4.2.6.	Cálculo do rendimento do extrato etanólico	50
4.3.	Quantificação de Polifenóis Totais	50
4.3.1.	Extrato obtido convencionalmente	51
4.3.2.	Extrato obtido pela extração supercrítica	51
4.4.	Avaliação da Atividade Antioxidante	52

4.5.	Avaliação da Atividade Antimicrobiana	53
4.5.1.	Método de microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO:	56
5.1.	Estudos Farmacológicos	56
5.1.1.	Determinação da Umidade da do C. palanostigma	56
5.1.2.	Análise Granulométrica da Casca do C. palanostigma	56
5.2.	Estudos Fitoquímicos	57
5.2.1.	Infravermelho	57
5.2.2.	Extração convencional	58
5.2.2.1.	Análise do Rendimento	58
5.2.2.2.	Quantificação dos Polifenóis Totais	66
5.2.2.3.	Avaliação da Atividade Antioxidante	73
5.2.2.4.	Avaliação da Atividade Antimicrobiana	80
5.2.3.	Análise da Função Desejabilidade	82
5.2.4.	Extração com Fluido Supercrítico	87
5.2.4.1.	Análise do Rendimento	87
5.2.4.2.	Quantificação dos Polifenóis Totais	88
5.2.4.3.	Análise da Atividade Antioxidante	88
5.2.4.4.	Análise da Atividade Antimicrobiana	89
6.	CONCLUSÃO	91
6.1.	Conclusão Geral	91
6.2.	Conclusões Específicas	91
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	92
8.	BIBLIOGRAFIA	93

RESUMO

O *Croton palanostigma* é conhecido popularmente como “sangue de dragão” e usado na medicina popular no tratamento de doenças inflamatórias e cicatrizante. Este trabalho propõe um estudo entre as metodologias de extração convencional e extração no supercrítico da casca do caule do *C. palanostigma*, visando avaliar nos extratos obtidos o rendimento, a quantidade de polifenóis totais, as atividades, antioxidante e antimicrobiana. Para o processo de extração convencional foi utilizado extrator encamisado de vidro, além de um planejamento fatorial experimental de três fatores e três níveis do tipo Box-Behnken, com o objetivo de determinar quais as variáveis (temperatura, o tempo de extração e a relação massa/solvente) poderiam influenciar no processo extrativo, para a quantificação dos polifenóis totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu, com algumas alterações e utilizando o ácido gráfico como padrão de referencia, para a análise da atividade antioxidante utilizou-se o método do IC₅₀, que mede a concentração necessária para se alcança 50% de decréscimo na absorbância do radical DPPH e para a análises antimicrobiológica foi utilizado o método de microdiluição, cujo objetivo foi a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de todos os ensaios frente as cepas bacterianas e fúngica estudadas. Os métodos de extração utilizados mostraram-se eficientes para a obtenção dos extratos, com algumas diferenças qualitativas, como por exemplo: cor, viscosidade e aroma. Quantitativamente a técnica de extração convencional apresentou um maior rendimento em seus ensaios, no entanto o mesmo demandou muito mais tempo de processo e maior quantidade de material utilizado, tanto botânico quanto de solvente, além de todas as variáveis avaliadas no estudo terem sido consideradas significativas para o processo, enquanto que na extração supercrítica o tempo utilizado foi significativamente menor, assim como também menor quantidade de material botânico e o co-solvente utilizado (álcool etílico). Para a quantificação dos polifenóis totais observou-se que a extração convencional (Ensaio 9; T=45°C; t=30min; g/mL=1;2) foi menos eficiente que as obtidas pela extração supercrítica (Ensaio 1; T=40°C; P=100 bar e Ensaio 3; T=60°C; P=300 bar) e tendo as variáveis significativas para a análise o tempo e relação massa/solvente. Para a atividade antioxidante o melhor resultado foi para a extração convencional (IC₅₀=30,71%) em relação ao Ensaio 3 (T=60°C; P=300 bar) da extração supercrítica (IC₅₀=52,36) e tendo as variáveis, tempo e Temperatura suas condições favoráveis para o processo. Para a análise antimicrobiana todos os extratos obtidos com a extração convencional apresentaram, em pelo menos uma de suas concentrações, atividades inibitórias frente a pelo menos uma das cepas patogênicas utilizadas no teste. Para as amostras obtidas da extração no supercrítico a ensaio 2 (T:60 °C; P:200bar) não apresentou atividade inibitória frente a nenhuma cepa bacteriana utilizada no teste, a cepa bacteriana *Enterobacter* não sofreu inibição de nenhuma das amostras do supercrítico para a temperatura de 60°C e a *E. coli* também não apresentou inibição frente as amostras da extração supercrítica com exceção do ensaio 1(=40°C; P=100 bar).

Palavras-chave: *Croton*, métodos de extração, atividade antioxidante, atividade antimicrobiológica.

ABSTRACT

The *Croton palanostigma* is popularly known as "dragon blood" and used in folk medicine for the treatment of inflammatory diseases and wound healing. This paper proposes a study between the methodologies of conventional mining and extraction in supercritical carbon dioxide of stem bark of *C. palanostigma*, aiming to evaluate the extracts obtained income, the amount of total polyphenols, activities, antioxidant and anti-microbial. For the extraction process was conventional used jacketed extractor glass, in addition to a factorial design experiment of three factors and three levels of type Box-Behnken, with the objective of determining which variables (temperature, the extraction time and the relationship between mass/solvent) could influence the process, extraction for quantification of total polyphenols was used the method of Folin-Ciocalteu, with some changes and using the chart acid as a standard of reference, to analyze the antioxidant activity, we used the method of IC50, which measures the concentration needed to reach 50% of decrease in absorbance of DPPH radical and to the analysis antibiologicial was used the method of microdilution, whose goal was the determination of the minimum inhibitory concentration (CIM) Of all the tests ahead of the bacterial and fungal studied. The extraction methods used were efficient to obtain the extracts, with some qualitative differences, such as for example: color, viscosity and flavor. Quantitatively, the technique of conventional extraction presented a higher yield in their tests, however the same demanded much more time to process and greater amount of material used, both as botanist of solvent, in addition to all the variables assessed in this study were considered significant for the process, while the extraction supercritical the time used was significantly lower, as well as a lesser amount of botanical material and the co-solvent used (ethyl alcohol). For the quantification of total polyphenols found that the conventional extraction test 9 (T=45°C; t=30 min; g/mL=1:2) was less efficient than those obtained by extracting supercritical (Test 1; T=40°C; P=100 bar and Test 3; T=60°C; P=300 bar) and having significant variables for the analysis time and relationship between mass and solvent. For antioxidant activity the best result was to extract conventional (IC50=30.71%) in relation to the test 3 (T=60°C; P=300 bar) to extract supercritical (IC50=52.36) and having the variables, time and temperature its favorable conditions for the process. To analyze microbial all extracts obtained with the conventional extraction showed, in at least one of their concentrations, inhibitory activity against at least one of the pathogenic strains used in the test. For the samples obtained from the extraction in supercritical carbon dioxide to test 2 (T:60 °C; P:200bar) showed no inhibitory activity against any bacterial strain used in the test, strain, bacterial *Enterobacter* did not suffer disqualification for none of the samples of supercritical carbon dioxide at a temperature of 60°C and *E. coli* also did not inhibit forward samples of extraction supercritical except test 1(T=40°C; P=100 bar).

Keywords: Croton, methods of extraction, antioxidant activity, activity antibiologicial.

LISTA DE ABREVEATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type culture collection</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CA	Com Atividade
CIM	Concentração inibitória mínima
Cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de Carbono
DPPH	2,2-difenil-1-pecrilidrazil
<i>E. Coli</i>	<i>Echerichia Coli</i>
EAG	Equivalente Ácido Gálico
EE	Extrato etanólico
g	Gramma
H	Horas
Hz	Hertz
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IV	Espectroscopia no Infravermelho
KBr	Brometo de potássio
Kg	Kilograma
L	Litro
MAE	Extração assistida por microondas
Mg	Miligrama
MHC	Caldo Muller-Hinton
Min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro

mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
MTT	Sal de tetrazólio
Nm	Nanômetro
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde.
p.a.	Puro para análise
PBB	Planejamento Box-Behnken
P _C	Pressão Crítica
pH	Potencial de Hidrogênio
PI	Padrão Interno
PT	Polifenol Total
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN _q	Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa
RPM	Rotação por minuto
RPM	Rotação por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella typhi</i>
AS	Sem Atividade
SFE	Extração com Fluido Supercrítico (do inglês Supercritical Fluid Extraction)
T _c	Temperatura Crítica
UV	Ultravioleta
vis.	Visível
Λ	Comprimento de Ondas
P _c	Massa específica Crítica
Mg	Micrograma
μL	Microlitro

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

Figura 1: Visão geral da planta <i>Croton palanostigma</i> Klotzsch	21
Figura 2: Estrutura Molecular do Aparistmano e da Cordatina	22
Figura 3: Diterpenos isoladas do óleo obtido casca do caule do <i>Croton palanostigma</i>	24
Figura 4: Fases de um fluido supercritico	28
Figura 5: Atividade Antioxidante	38
Figura 6: Cascas do caule de <i>Croton palanostigma</i>	41
Figura 7: Material botânico	42
Figura 8: Equipamentos da Extração Convencional	46
Figura 9: Fluxograma do processo de extração supercrítica	47
Figura 10: Unidade de Extração Supercrítica	48
Figura 11: Equipamentos utilizados na Extração Supercrítica	48
Figura 12: Destilação em rota evaporador em funcionamento	50
Figura 13: Calibração com Ácido Gálico para o teste de quantificação de polifenóis totais	51
Figura 14: Placa de 96 poços para os testes de Concentração Inibitória Mínima	55
Figura 15: Gráfico da Distribuição Granulométrica do pó da casca do <i>Croton palanostigma</i>	57
Figura 16: Gráfico do Infravermelho da casca do <i>Croton palanostigma</i>	58
Figura 17: Gráfico de Pareto para o Rendimento	63
Figura 18: Gráfico da Distribuição dos resíduos para o Rendimento	64
Figura 19: Gráfico do Teste de Normalidade para o Rendimento	65
Figura 20: Gráfico da Superfície de Resposta e Curva de Nível para Rendimento	66
Figura 21: Gráfico de Pareto para a Quantificação dos Polifenóis Totais	71
Figura 22: Gráfico da Distribuição dos resíduos em função dos valores preditos para a Quantificação dos Polifenóis Totais	72

Figura 23: Gráfico do Teste de Normalidade para a Quantificação dos Polifenóis Totais	72
Figura 24: Gráfico da Superfície de resposta e curva de nível para a Quantificação dos Polifenóis Totais	73
Figura 25: Gráfico de Pareto para Atividade Antioxidante	78
Figura 26: Gráfico da Distribuição dos resíduos para a Atividade Antioxidante	79
Figura 27: Gráfico do Teste de Normalidade para a Atividade Antioxidante	79
Figura 28: Gráfico da Superfície de Resposta e Curva de Nível (B) para Atividade Antioxidante	80
Figura 29: Gráfico da Função de incapacidade global para extração convencional	84
Figura 30: Gráfico do Rendimento dos ensaios na Extração Supercrítica	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Componentes dos óleos essenciais de <i>Croton palanostigma</i>	23
Tabela 2: Condições críticas para substancias mais utilizadas na Extração Supercrítica	29
Tabela 3: Estimativas padrão para escala de desejabilidade	34
Tabela 4: Classes e estruturas químicas dos compostos fenólicos.	36
Tabela 5: Variáveis de entrada e seus respectivos níveis	43
Tabela 6: Matriz do Planejamento da Extração Convencional	44
Tabela 7: Planejamento de Experimento Supercrítico	45
Tabela 8: Fator de diluição das soluções do supercrítico	52
Tabela 9: Dados utilizados para os cálculos do Diâmetro médio de Sauter	56
Tabela 10: Valores dos resultados do Rendimento	59
Tabela 11: Efeitos Estimados para Rendimento	61
Tabela 12: ANOVA para Rendimento	62
Tabela 13: Valores dos resultados dos Polifenóis Totais	67
Tabela 14: Efeitos Estimados para Quantificação dos Polifenóis Totais	69
Tabela 15: ANOVA para Quantificação dos Polifenóis Totais	70
Tabela 16: Valores dos Resultados para a Atividade Antioxidante	74
Tabela 17: Efeitos Estimados para Avaliação da Atividade Antioxidante	76
Tabela 18: ANOVA para Avaliação da Atividade Antioxidante	77
Tabela 19: Valores dos resultados da Concentração Inibitória Mínima	82
Tabela 20: Valores atribuídos na função desejabilidade global	83

Tabela 21: Resposta rendimento, Quantificação dos Polifenóis Totais, Atividade antioxidante e antimicrobiana para a extração convencional	86
Tabela 22: Resposta rendimento, Quantificação de Polifenóis Totais, Atividade Antioxidante e Antimicrobiana para a Extração Supercrítica	90

1. INTRODUÇÃO

Vários estudos fitoquímicos realizados com as espécies de *Croton* (família Euphorbiaceae), apontam em sua composição compostos como por exemplos os compostos fenólicos e os diterpenos, que são estudados nas áreas químicas dos produtos naturais, farmacológicos e etnofarmacológicos obtendo dados novos de extrema importância para o meio científico (SANTANA, 2011). Pesquisas aprofundaram-se, em especial para algumas espécies populares como a “sacaca” (*C. cajucara*) sobre os seus aspectos de composição química e suas atividades biológicas; “sangue do dragão” (*C. lechleri* e *C. draconoides*) são conhecidas assim pelo senso popular, devido apresentarem uma seiva viscosa e avermelhada quando extraída da casca do caule, “urucurana” (*C. urucurana*), “marmeleiro-preto” (*C. sonderianus*), e demais espécies muito utilizadas na medicina tradicional, que segundo OMS “refere-se ao total de conhecimento técnico e procedimentos baseado nas teorias, crenças e as experiências indígenas de diferentes culturas, sejam ou não explicáveis pela ciência, usados para a manutenção da saúde, como também para a prevenção, diagnose e tratamento de doenças físicas e mentais. Em alguns países utilizam-se indistintamente os termos medicina complementar, medicina alternativa ou medicina não-convencional, e medicina tradicional (SALATINO et al. 2007; ALBUQUERQUE et al. 2007).

O uso da planta medicinal foi relacionado com o efeito observado em ensaios farmacológicos dos extratos e substâncias isoladas. Apesar do amplo interesse da comunidade científica, considerando-se a diversidade do gênero, a lista de espécies estudadas ainda é demasiadamente escassa (ALBUQUERQUE et al. 2007).

O metabólito secundário, diterpeno, e os constituintes do óleo essencial, monoterpenos e sesquiterpenos, são os mais estudados no gênero *Croton*. Já o grupo dos terpenoides é tão complexo e diverso que vários compostos não tiveram suas atividades elucidadas (DEWICK, 2009; FELIU, 2011).

O *Croton palanostigma* Klotzsch conhecida popularmente como “marmeleiro” ou balsa-rana é conhecida por suas propriedades fitoterápicas, o látex oriundo das cascas do caule da planta possui caráter anti-inflamatório, anti-reumático, na cicatrização de feridas, hemorragias, gastrites e úlceras (AYALA et al., 2001).

Um estudo realizado com as cascas do caule da planta levou ao isolamento e identificação estrutural de dois diterpenos com esqueleto clerodano, denominados

Aparistimano e Cordatina, e posteriormente estudos químicos desta espécie vegetal (cascas do caule e folhas) foi retomado e levou ao isolamento e identificação estrutural de vinte e seis (26) substâncias químicas (BRASIL, 1999).

De acordo com os estudos químicos e farmacológicos realizados com o *C. palanostigma* e seus componentes, evidenciou-se a grande importância pela busca de informações mais precisas sobre esta planta. Desta forma, os processos de extração desse vegetal foram desenvolvidos para uma maior compreensão a cerca das melhores condições de obtenção dos extratos orgânicos e das substâncias bioativas para a utilização destes na avaliação biológica.

De acordo com Cos (2006), o período de coleta, o teor de umidade, o tipo de extração, o solvente utilizado dentre outros fatores podem influenciar tanto qualitativamente quanto quantitativamente as atividades antioxidantes e antimicrobiológico dos extratos obtidos.

Até o presente momento, nenhum estudo avaliou a influencia dos processos extrativos em relação a quantificação dos polienóis totais, atividade antioxidante e das atividades antimicrobianas, visando obter extratos com maior potencial de atividade biologica esclarecendo se este efeito é bacteriostático, bactericida ou se possui os dois potenciais e se o estresse oxidativo esta envolvido nesta atividade.

2. OBJETIVOS

2.2. Objetivo Geral

Realizar um estudo dos métodos de extração sólido-líquido convencional e por fluido supercrítico, considerando a capacidade extratora dos mesmos. Quantificar os compostos fenólicos, e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

2.3. Objetivos Específicos

- a) Estudar o processo de extração sólido-líquido das cascas do caule de *C. palanostigma* Klotzsch utilizando álcool etílico como solvente, a partir de experimentos estatisticamente planejados.
- b) Estudar o processo de extração com fluido supercrítico utilizando CO₂ como fluido extrator e álcool etílico como co-solvente;
- c) Quantificar os polifenóis totais dos extratos;
- d) Avaliar o potencial antioxidante dos extratos;
- e) Avaliar a atividade antimicrobiana nos extratos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Considerações sobre *Croton*

O *Croton* pertence a família Euphorbiaceae que por sua vez pertence à ordem Malpighiales (APGIII, 2009), que é uma das mais diversificadas e complexas entre as Angiospermae, com aproximadamente 8000 espécies (LIMA, 2006). O país que apresenta a maior diversidade do gênero é o Brasil (BERRY, 2006). Estudos químicos com espécies da família Euphorbiaceae revelaram a presença de compostos químicos biologicamente ativos variados, como por exemplo os terpenoides. (BITTNER et al. 2001; SOUZA et al. 2005; ROGÉRIO et al. 2007; RAJESH et al. 2006).

As plantas do gênero *Croton* tem sido foco de grande interesse para as pesquisas científicas visto que a variedade de usos medicinais nas diferentes regiões do mundo é proporcional a toda variabilidade inerente ao gênero. Cascas, folhas, raízes e sementes são utilizadas no tratamento de uma série de males, tais como diabetes, colesterol alto, problemas gastrointestinais, leucemia, reumatismo, diarreia, anorexia, hepatite, obesidade, problemas respiratórios, como antiinflamatório, analgésico e até mesmo adoçante. (SALATINO et al. 2007). Ele é constituído por espécies de hábito arbustivo e arbóreo, sendo poucas de porte herbáceo. A maioria das suas espécies está distribuída na América do Sul e Antilhas, com expressiva ocorrência na Amazônia.

Os metabólitos secundários predominante do *Croton* é o terpenóide principalmente, a classe dos diterpenos que possuem os esqueletos: cembranoides, clerodanos, neoclerodanos, halimanos, isopimaranos, cauranos, sarcopetalanos, labdanos, ésteres do forbol e traquilobanos (BLOCK et al. 2004).

Várias espécies do gênero são aromáticas, indicando a presença de óleos voláteis que podem conter mono e sesquiterpenoides e, às vezes, compostos derivados do chiquimato (OLIVEIRA et al. 2001a; LOPES et al. 2003; SALATINO et al. 2007). O látex é uma substância que está associada a propriedades medicinais, podendo em algumas espécies ser de cor vermelha e conter pró-antocianidinas e/ou alcaloides (SANDOVAL et al. 2002; RISCO et al. 2003). Outros metabólitos frequentemente relatados são os triterpenos e compostos fenólicos, como flavonóides, lignóides e pró-antocianidinas (SALATINO et al. 2007; BARRETO et al. 2013).

De acordo com Costa (2008) existe uma variação na concentração dos compostos químicos que são mais abundantes nos óleos essenciais, podendo esses constituintes serem

encontrados em diversas partes da planta como no caule e nas folhas. Foi observado também que os componentes químicos também podem variar de acordo com o método de extração (SOUZA et al. 2005).

- *Croton palanostigma*

O *C. palanostigma*, sinônimo *C. benthamianus* (TROPICAL, 2013), também conhecida como balsa-rana e mameleiro ou marmeleiro como demonstrado na Figura 1, é uma árvore de porte médio que apresenta um látex viscoso sendo esta nativa da região Amazônica do Brasil também havendo ocorrência em diversos países da América do Sul, como México, Venezuela, Equador e Peru.

Figura 1: Visão geral da planta *Croton palanostigma* Klotzsch



Fonte: SECCO (2008)

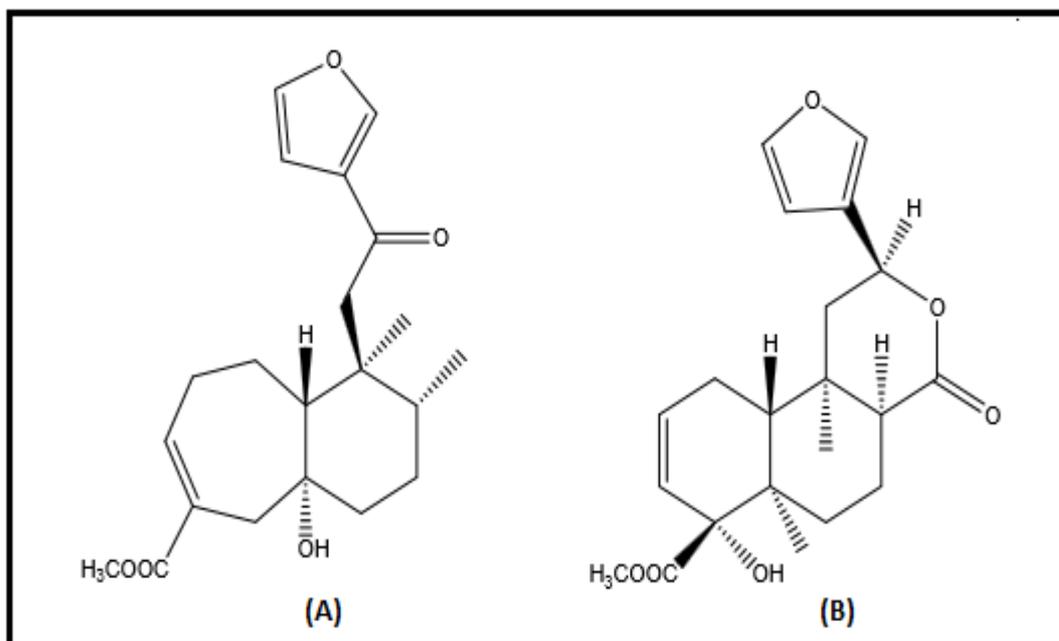
Ela apresenta geralmente espécies com folhas palmatinérveas e com denso indumento de tricomas estrelados na face abaxial, estames 10-100, flores pistiladas pediceladas, com sépalas mais ou menos reduplicado-valvadas e estiletos multífidos. As partes da planta mais utilizadas para fins medicinais são: folhas, casca do caule e látex ou resina da casca do caule. Estudo fitoquímico demonstrou que os metabólitos secundários principais desta espécie, ditêpenos, concentraram-se nas cascas do caule, voltando-se o foco da pesquisa para os extratos para essa parte do espécime, obtendo-se extratos hexânico, diclorometânico e metanólico.

Para Simionatto et al. (2007), *Croton palanostigma*, possui como constituintes de seu látex, óleos voláteis, proantocianidinas, alcaloides e diterpenos (principalmente do tipo clerodano). Enquanto que Salatino et al. 2007 diz que parece existir uma afinidade química entre as espécies relacionada com a distribuição geográfica.

Após um equívoco na identificação botânica inicial do *C. palanostigma* a espécie vegetal foi descrita na literatura como *Aparishimium cordatum* (MULLER et al. 1986) (DADOUN et al. 1987), equívoco este que foi resolvido em 2008 pelo Dr. Ricardo Secco classificando-o corretamente como *C. palanostigma* (Exsicata: MG 182.822) (BRASIL, 2008).

No trabalho de Brasil (1999), um estudo químico foi realizado isolando e identificando a estrutura de dois diterpenos com esqueleto clerodano, denominados Aparistmano e Cordatina como pode ser visto na Figura 2, e de mais vinte e seis (26) substâncias químicas dentre elas 8-epicordatina. De acordo com Hiruma-Lima et al.(2000a, 2001), foi comprovado que o aparistmano e a cordatina possuíam um potencial antiulcerogênico.

Figura 2: Estrutura Molecular do Aparistmano e da Cordatina



Fonte: BRASIL, 2008

Legenda: (A) Aparistmano e (B) Cordatina

A medicina popular atribui inúmeras propriedades medicinais à planta, alguns estudos realizados com o látex demonstram diversas ações biológicas como: a) indução da formação do muco gástrico (SANDOVAL et al. 2002a) b) indução da apoptose em células

gastrointestinais humanas cancerosas (SANDOVAL et al. 2002b) no tratamento de bronquites, asma, anemia, transtornos renais, disenterias ,reumatismo, infecções vaginais, no tratamento de dor de dente entre outros usos (LORENZI e ABREU DE MATTOS, 2002; GURGEL et al. 2002 e GUPTA et al. 2008) e c) efeito antioxidante sobre a mucosa gástrica (SANDOVAL et al. 2006).

Os principais componentes dos óleos essenciais de *C. palanostigma* estão listadas na TABELA 1 e alguns exemplos de estruturas isoladas e identificadas dos diterpenos, estão demonstradas na FIGURA 3. (BRASIL, 2009).

TABELA 1: Componentes dos óleos essenciais de *Croton palanostigma*

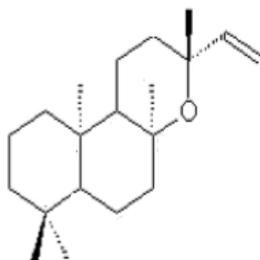
I.R	Compostos	F*	RF*	G*	C*	FR*
939	a-pineno	1,3	44,2	11	31,6	2,9
975	sabineno	0,8		3,4	1,0	0,2
980	β-pineno		15,9	0,1	2,3	1,7
1017	α-terpineno		2,5	0,1		
1025	p-cimeno		4,0	0,5		
1029	limoneno		24,7	4,0	1,6	
1032	1,8-cineol	2,4				3,1
1097	linalol	25,4	0,4	3,4	1,1	43,0
1338	d-elemeno	2,0	0,1	0,6		3,1
1391	β-elemeno	6,0	tr	2,8	1,1	6,4
1404	metileugenol	17,2	0,3	23,8	25,6	16,0
1419	β-cariofileno	21,0	0,1	8,3	0,8	3,8
1435	trans-a-bergamoteno	2,9	0,1	3,7	1,9	1,7
1455	a-humuleno	3,1	0,1	1,7	0,4	0,8
1492	(E)-metilisoeugenol	tr		15,0	23,7	
1500	biciclogermacreno	4,2				4,7
1557	elemicina	0,9		1,4	0,3	1,4
1654	a-cadinol	1,3		2,1	2,9	1,2
Total da composição (%)		88,5	92,4	81,9	94,3	90,0

*F = folhas; RF= ramos finos; G = galhos; C = cascas; FR = frutos.

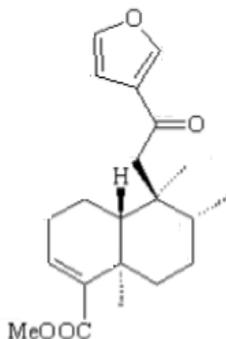
Fonte: BRASIL, 2009

Figura 3: Diterpenos isolados do óleo obtido casca do caule do *Croton palanostigma*

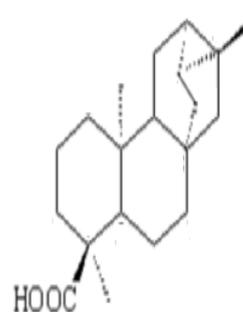
Óxido de *ent*-13-epimanoila



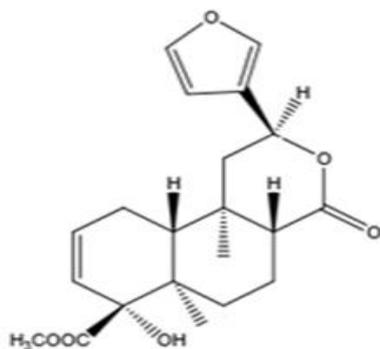
Éster metílico do ácido 12-oxohardwickico



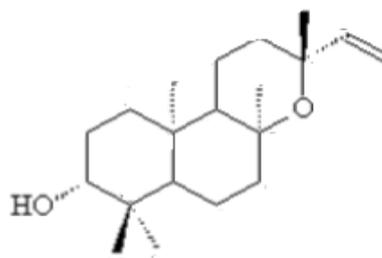
Ácido *ent*-trachiloban-18-óico



8-epicordatina



Ribenol



Fonte: Brasil (2008)

3.2. Processo de extração de produtos naturais

Existem várias técnicas de extração de produtos naturais, a escolha adequada vai depender do material botânico escolhido e para que fins serão utilizados o produto. De acordo com Simões et al. (2000), alguns fatores como a localização geográfica, época da coleta, forma de cultivo, condições climáticas, idade do material vegetal, período e condições de armazenamento podem influenciar o rendimento e o perfil químico dos extratos de plantas. Além desses fatores também podemos considerar uma série de variáveis que são significativas para a extração tais como a granulometria do material, a polaridade do solvente, a acidez do meio, a agitação, a temperatura, a pressão, o tempo de extração, etc (SOARES et al. 1998).

Na escolha de um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a seletividade, a estabilidade das substâncias extraídas e o custo do processo escolhido, considerando principalmente a finalidade do extrato que se quer preparar (SIMÕES et al. 2003).

No estudo realizado por Brasil em 2008, o rendimento dos óleos *C. palanostigma* apresentaram-se da seguinte maneira: folhas, 0,7%; ramos finos, 0,6%; galhos, 0,3%; casca, 2,2%; e fruto, 0,5%. Os principais componentes identificados foram monoterpenos hidrocarbonetos e oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados e fenilpropanóides. Desta forma de acordo com o referido estudo foram utilizados para este estudo as cascas do caule *C. palanostigma*.

Maceração

É um método simples e amplamente utilizado, estático ou dinâmico, que consiste em por em contato o material botânico, já pronto, com uma quantidade de solvente preestabelecida, à temperatura ambiente, em um recipiente fechado, por um período de aproximadamente 14 dias. Este processo não é seletivo o que resulta em um equilíbrio de concentração no sistema, além disso, pode ser influenciado por alguns fatores tais como, o tamanho da partícula, o grau de umidade, a massa e a natureza do material botânico e a seletividade e o volume do solvente. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

O processo tem algumas desvantagens dentre elas estão, a lentidão, a não seletividade, a impossibilidade de extrair totalmente os princípios ativos do material botânico além da possibilidade de contaminações, quando se empregam solventes com grande quantidade de água. A maceração pode ser repetida varias vezes, sendo o processo conhecido como maceração múltipla.

Percolação

É um processo dinâmico que consiste em submeter o material botânico, devidamente armazenado em um recipiente cilíndrico ou cônico (percolador de vidro ou metal), à ação de um solvente, que faz o arraste do princípio ativo, pela passagem contínua do líquido extrator, que atravessa toda extensão do recipiente, se deslocando de cima para baixo, levando ao esgotamento da planta através do gotejamento lento do material. O produto obtido é denominado de percolado, também permite obter soluções extrativas mais concentradas, gradiente de polaridade, economia do líquido extrator e tempo relativamente curto. A

percolação é indicada em processos extrativos de substâncias farmacologicamente, muito ativas, presentes em pequena quantidade ou pouco solúveis, ou ainda quando o preço do material botânico é relativamente alto (NAVARRO, 2005).

Extração com Soxhlet

É considerado um caso particular de lixiviação. Ele apresenta algumas restrições ligadas ao elevado tempo de extração, que dura em torno de 72 H (MIGUEL et al. 1989). Neste processo o solvente extrai os compostos orgânicos contidos na amostra à temperatura próxima a do ambiente, no entanto o material extraído continua em contato com o solvente em ebulição durante todo o processo, isto pode provocar transformações químicas nos componentes extraídos.

Extração com Ultrassom

O processo consiste em juntar o material botânico preparado e o solvente em um recipiente, e este é imerso em um banho de ultrassom. A amostra é submetida, geralmente, a vários solventes em ordem crescente de polaridade, dependendo da classe de compostos a serem extraídos, há um tempo determinado e a uma frequência própria do banho. O extrato é submetido à filtração e concentração. São inúmeras as vantagens do processo, tais como a alta reprodutibilidade da técnica, sua utilização para uma ampla faixa de tamanho de amostra, rapidez no processamento da amostra, uso de pouca quantidade de solvente, baixo custo e pequeno número de interferentes (RODRIGUES, 2002).

Extração assistida por micro ondas

Neste processo o material botânico é colocado dentro de um balão de fundo redondo com água destilada (solvente), em seguida o balão é colocado dentro do forno micro-ondas, programa-se a potência e o tempo de extração do aparelho, que geralmente ocorre em minutos. A extração se inicia quando a água alcança a sua temperatura de ebulição e começa arrastar os constituintes presentes na amostra que seguem para o condensador onde sofrem resfriamento rápido e o condensado é depositado no coletor. A separação do óleo essencial é realizada por centrifugação (NASCIMENTO, 2011).

Extração com Fluido Supercrítico

Segundo Hannay e Hogarth (1876), após a observação experimental do aumento da solubilidade de substâncias químicas com o aumento simultâneo da pressão e da temperatura, conduziu a um importante avanço científico e tecnológico: o uso de fluidos supercríticos.

O processo de extração dos componentes químicos de matérias primas, por diversos solventes, passou a ser bastante difundido na comunidade científica. No entanto, observou-se que apesar desse processo produzir produtos de muita qualidade também pode acarretar problemas relacionados tanto a temperatura, já que após a extração o solvente utilizado deve ser removido por evaporação ou destilação à pressão reduzida, como por exemplo, danos aos componentes altamente sensíveis a temperaturas elevadas e princípios ativos farmacêuticos e também a perda de componentes voláteis de baixo peso molecular que não poderão ser mais recuperados e reincorporados aos extratos, quanto em relação aos solventes, os quais são praticamente impossíveis de remover sem um grande desperdício de energia e custos, além do que todo o solvente residual pode vir a causar alterações químicas nas moléculas provocando efeitos tóxicos nos consumidores.

Segundo Pellerin (1991) o CO₂ supercrítico utilizado nas extrações é eficaz nas questões associadas às altas temperaturas e ao uso dos solventes orgânicos, pois além de utilizar um único solvente também opera em baixas temperaturas dissipando-se totalmente no fim da extração, após a decompressão, sendo um componente do ar atmosférico.

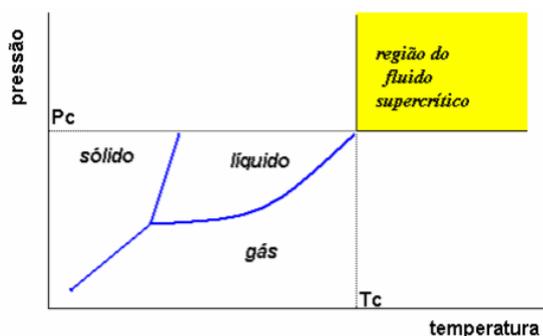
No estudo de Sargenti (1994) foi relatado que o estado supercrítico na prática é obtido quando um gás ou um líquido tem sua pressão e temperatura elevados modificando desta forma as propriedades das substâncias de interesse. Tais alterações conduzem a uma mudança de densidade e poder de solvatação, alterando assim o comportamento químico da substância pretendida. Um exemplo claro disso é a água que é considerada uma substância polar em condições normais de temperatura e pressão, mostra constante dielétrica próxima de zero quando submetida a elevadas temperaturas e pressões.

Podemos descrever o estado de fluido supercrítico iniciando-se com uma substância no estado líquido e aumentando sua temperatura à uma pressão constante, diminui-se também de forma contínua a sua densidade, tendendo a mesma a um estado gasoso. Se a pressão for suficientemente alta, não permitindo que a substância atinja o estado gasoso, ela permanecerá em um estado intermediário (entre gás e líquido). Assim, se ambas as condições, tanto pressão como a temperatura forem superiores à temperatura e a pressão críticas, a substância é dita no

estado supercrítico, como mostra o Diagrama 1. Caso esteja, pelo menos uma delas abaixo destes valores, diz-se que a substância encontra-se no estado subcrítico.

Um fluido supercrítico mantido a densidade relativamente alta é capaz de dissolver uma variedade de materiais, exatamente como fazem os líquidos convencionais, mas com o poder de penetração próximo dos gases (KNOWLES, 1988).

Figura 4: Fases de um fluido supercrítico



Fonte: Knowles (1988)

Em relação as propriedades físicas de um fluido supercrítico, diz-se que elas são intermediárias, ou seja, estão entre as propriedades de um gás e as de um líquido típicos. Podemos destacar entre elas a compressibilidade que é semelhante a de um gás, a dissolução de solutos, a viscosidade baixa que é semelhante a de um gás e a difusão intermediária entre a de gases e líquidos.

Outro grande exemplo é a densidade de um fluido supercrítico que pode ser mudada pela variação da pressão aplicada sobre o fluido. Assim, o fluido supercrítico pode ter, quando comprimido a altas temperaturas, densidades oscilando entre as exibidas pelos gases e as típicas dos líquidos (HAWTHORNE, 1993, 1995, 1998).

As propriedades críticas são características peculiares de cada substância. A Tabela 2 oferece um quadro conciso dos solventes mais empregados em extrações com fluidos supercríticos, junto com seus parâmetros críticos P_c (pressão crítica), T_c (temperatura crítica) e ρ_c (massa específica crítica).

TABELA 2: Condições críticas para substancias mais utilizadas na Extração Supercrítica

Solvente	Temperatura Crítica (°C)	Pressão Crítica (atm)	Massa Especifica Crítica (g.cm ⁻³)
Acetona	235	46,39	0,279
Água	374	217,17	0,323
Amônia	133	111,54	0,236
Benzeno	289	48,27	0,302
Dióxido de Carbono	31,1	72,85	0,469
Etano	32	48,17	0,203
Etanol	241	60,61	0,276
Éter etílico	194	35,93	0,265
Etileno	9	49,65	0,218
Metanol	240	79,86	0,272
Oxido nitroso	36,5	71,5	0,452
Piridina	347	55,57	0,312
Propano	97	41,85	0,217
Tolueno	319	40,57	0,293

Fonte: Hawthorne (1990)

O gás carbônico é o fluido supercrítico mais comumente usado neste processo pois possui propriedades de excelentes qualidades de extração. É indicado para extração de uma grande faixa de substratos naturais.

As indicações gerais da extração com dióxido de carbono (CO₂) supercrítico podem ser resumidas da seguinte maneira:

- Compostos lipofílicos, como hidrocarbonetos, éteres, ésteres, cetonas e aldeídos, são facilmente extraídos;
- Substâncias polares como açúcares, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, fosfatídeos, glicosídeos e sais orgânicos, não solúveis;
- O fracionamento é possível quando as substâncias apresentam diferenças na volatilidade, no peso molecular ou na pressão de vapor;
- Temperatura crítica (31,04°C): as extrações podem ser conduzidas a uma temperatura suficientemente baixa para não alterar as propriedades organolépticas e químicas dos extratos;
- Pressão crítica (73,8 bar): fácil de obter e trabalhar em processo de produção industrial;

- Inerte, não oferecendo riscos de reações secundárias como oxidações, reduções hidrólises e degradações químicas;
- Seguro, pois o CO₂ é um material inofensivo, não explosivo, não poluente, não tóxico e de uso significativo na gaseificação de bebidas;
- A polaridade do gás carbônico está próxima à do pentano e do n-hexano, solventes comumente usados em extrações tradicionais por solventes;
- Versátil, pois os parâmetros de extração do dióxido de carbono supercrítico podem ser modificados facilmente pela adição de pequenas quantidades de outros produtos, chamados de modificadores, polares ou apolares, como a água e o etanol, e também pela seleção das condições de extração às necessidades específicas dos produtos a serem extraídos e ao produto final desejado.

A obtenção de compostos antioxidantes mediante extração com gases, como o dióxido de carbono, sob condições críticas de pressão e temperatura constitui método moderno e eficiente. Algumas substâncias como o metanol e o etanol, podem ser utilizadas como cosolventes, melhorando o rendimento e a seletividade dos extratos (POKORNY; KORCZAK, 2001).

A metodologia de extração de sólidos com o fluido supercrítico diz que, matérias primas sólidas podem ser maceradas ou moídas para facilitar a extração. Depois da matéria preparada ele é colocada no cilindro extrator, que possui em cada uma de suas extremidades uma capa de metal poroso que permite a livre circulação do fluido supercrítico e das substâncias que serão dissolvidas, enquanto que o resíduo sólido permanece em seu devido lugar. Logo que o fluido extrator passa através da matéria primas, os aromas, os óleos e os demais compostos existentes na amostra são dissolvidos e extraídos até um nível de solubilidade de equilíbrio, que é de cerca de 10% p/p. A solução gasosa sai do extrator e passa através da válvula redutora de pressão, causando a precipitação dos componentes no separador; os aromas, óleos e demais compostos existentes na amostra são separados do fluido extrator e então reciclados pelo compressor, continuando o ciclo até que todos os componentes sejam extraídos e coletados no separador. A quantidade do gás, o fluxo, a temperatura, a pressão e o número de ciclos de extração são selecionados e calculados para otimizar a extração e dependem do produto e dos componentes que se queiram extrair. Devido a essa diversidade de parâmetros possíveis, uma grande variedade de matérias primas sólidas podem ser efetivamente extraídas por esse processo (Trease 1996).

Neste caso, o extrator é uma coluna de extração líquida clássica, especialmente construída para o uso sob altas pressões. A matéria líquida é injetada na coluna, mantendo-se um fluxo em contra corrente do fluido extrator. Como na extração de sólidos, selecionam-se os parâmetros de temperatura, pressão e reciclagem, para a otimização do processo. Através deste processo pode-se realizar a extração de uma grande variedade de matérias primas.

Muitas são as vantagens oriundas da extração supercrítica. Dentre elas podemos destacar algumas, como por exemplo:

- Os solventes utilizados geralmente são gasosos à pressão normal e à temperatura ambiente, permitindo que, após a extração, eles sejam facilmente retirados dos resíduos e dos produtos extraídos e recuperados;

- As propriedades solvente dos gases comprimidos podem ser gradativamente variadas, tanto pelo ajuste apropriado da temperatura e da pressão quanto pela introdução de agentes aditivos que mudem a polaridade dos gases e, pela alteração gradual da temperatura e da pressão, possibilitando extrações multifases e fracionamento do extrato nos produtos desejados;

- A força solvente é ajustada via compressão mecânica;

- A adição de solventes modificadores permite a extração diferencial desde solutos não polares até solutos de polaridade alta;

- Adição de solventes modificadores orgânicos aumentando a solubilidade do material a ser extraído;

- Os solventes podem ser reusados, possibilitando baixo custo operacional;

Podemos citar também algumas desvantagens do processo de extração supercrítico:

- O processo é dispendioso devido ao custo dos equipamentos e, assim, produtos de baixo valor agregado e baixo rendimento não podem ser economicamente extraídos por esse processo;

- Os compostos polares dificilmente serão extraídos sem a adição de um solvente modificador adequado.

Existem vantagens e desvantagens entre alguns métodos de extração, segundo a literatura consultada indicadas abaixo:

Extração com Soxhlet: tem como vantagem ser um método padrão, não necessita de filtração; não depende de matriz experimental e possui baixo custo; já como desvantagem podemos citar a necessidade de um tempo alevado, utiliza grande quantidade de solvente e desta forma também de evaporação.

Extração por ultra-som: sua vantagem é ser um método rápido não depende de matriz experimental e possui baixo custo; sua desvantagem esta em ser um método trabalhoso; necessita de grande quantidade de solvente, filtração e exposição aos vapores do solvente.

Extração assistida por microondas (MAE): sua vantagem esta em ser um método rápido, utiliza pouca quantidade de solvente e permite os parametros completos de extração; suas desvantagens estão na necessidade de altas temperaturas, utiliza solventes polares necessita de limpeza a cada extração e possui um custo moderado.

Extração com fluido super critico (SFE): sua vantagem esta em ser um método rápido, o CO₂ não é contaminante do meio ambiente, método seletivo quando se variam pressão e temperatura, necessita de pequena quantidade de solvente, não necessita de filtração; não necessita de contato com solventes e pode ser totalmente automatizado, suas desvantagens esta no alto custo de operação e dependente de matriz experimental. (CONTE et al. 1997; OZCAN, 2004).

3.3. Planejamento de Experimento

O estudo estatístico mais importante não consiste somente em analisar dados mas também em planejar experimentos em que esses dados sejam obtidos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, et al. 2007). A necessidade crescente de otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempos, maximizando rendimento, produtividade e qualidade dos produtos, dentre outros objetivos, tem levado profissionais de diferentes formações a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (RODRIGUEZ; IEMMA, et al. 2009).

O planejamento consciente dos experimentos deve ser realizado para determinar, e mesmo quantificarem, a influência das variáveis sobre as respostas desejadas, é indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos e para que as análises estatísticas consistentes possam ser realizadas (RODRIGUES; IEMMA, et al. 2009). O planejamento experimental vem sendo utilizado com o objetivo de aprimorar metodologias, melhorando a desempenho de análises.

Alguns exemplos dessas metodologias são: planejamentos fatoriais completos e fracionários, a metodologia de superfície de resposta (MSR), modelagem por mínimos quadrados, entre outros. Essas metodologias estatísticas implicam a elaboração de um planejamento experimental, caracterizado por uma série de fatores que agem sobre a resposta investigada. O resultado final é a identificação, observação e quantificação das alterações nas variáveis. (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

De maneira geral, os planejamentos experimentais trabalham com fatores chamados de variáveis independentes (\mathbf{x}) em diferentes valores ou níveis (n). Além disso, o planejamento experimental tem por finalidade estudar uma resposta chamada variável dependente (\mathbf{y}).

Os níveis de planejamento podem ser dois, três ou até cinco níveis de cada fator em questão. O total de ensaios realizados depende do número de fatores e de níveis. Assim, $n^x = n^\circ$ total de ensaios a serem realizados, ou seja, quando temos dois fatores a serem estudados em dois níveis teremos $2^2 = 4$ ensaios (BOX e BEHNKEN, 1960).

3.3.1. Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

A metodologia de superfície de resposta (MSR) compreende um grupo de técnicas estatísticas utilizadas para explorar e construir modelos matemáticos através de um planejamento cuidadoso e de análise dos resultados relacionando a resposta obtida e os fatores que os afeta, calculando a resposta em níveis intermediários que não foram realizados experimentalmente direcionando para o objetivo desejado aumentando ou diminuindo a resposta. Além disso, a MSR permite que seja estimada a interação e até mesmo os efeitos quadráticos dos fatores possibilitando saber o formato da superfície da resposta estudada utilizando como objetivo o encontro de condições ótimas ou melhoramento das condições já utilizadas, apontando problemas ou pontos fracos no processo, melhorando a robustez de produtos ou processos em relação a influências externas ou não controláveis (MUTHUKUMAR, MOHAN E RAJENDRAN, 2003).

Por isso, há alguns planejamentos que são mais utilizados para estudar a MSR e entre eles encontra-se o planejamento Box-Behnken. Este planejamento possui características desejáveis com apenas uma fração do total de ensaios requeridos em um planejamento fatorial completo de três níveis.

3.3.2. Função Desejabilidade

A metodologia de planejamento fatorial com análise por meio de superfícies de resposta utiliza o ajuste dos dados experimentais a um modelo quadrático para se buscar em que faixa de valor dos fatores estudados uma resposta específica do processo é ótima. O modelo quadrático inclui os efeitos linear e quadrático e os efeitos de interação de primeira ordem entre os fatores. O ajuste deste modelo é feito separadamente para cada resposta ou variável do processo. No desenvolvimento de um produto ou processo, existe a necessidade de selecionar condições de processo que irão resultar num produto ou processo com as qualidades desejadas.

Para se otimizar funções com várias respostas baseadas no conceito de utilidade ou desejabilidade de uma propriedade associada a uma função resposta, foi introduzida, por Harrington (1965). Esta técnica consiste na transformação de cada função resposta preditiva Y_i ($i = 1, 2, \dots, r$), em suas correspondentes funções desejabilidade (d_i), $0 < d_i \leq 1$, tal que d_i cresça a medida que a desejabilidade da propriedade correspondente cresça (KHURI E COENELL 1987).

A desejabilidade, portanto, consiste em três etapas:

Conduzir os experimentos e ajustar as respostas dos modelos para todas as k respostas;

Definir as funções desejabilidade individuais para cada resposta;

Maximizar a desejabilidade global D , em relação aos fatores controlados.

Segundo Akhanazarova e Kafarov (1982), os valores numéricos de d e D e seus respectivos conceitos de qualidade, podem ser classificados de acordo com os índices sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3: Estimativas padrão para escala de desejabilidade

Valores d ou D (Desejabilidade)	Descrição da resposta (qualidade equivalente)
0,80 a 1,00	aceitável e excelente
0,62 a 0,80	aceitável e bom
0,37 a 0,63	Aceitável porém pobre
0,20 a 0,37	valor limite
0,00 a 0,20	Inaceitável

Fonte: Akhanazarova e Kafarov (1982)

3.4. Métodos de caracterização dos extratos

Os principais instrumentos para separação, caracterização e identificação de moléculas orgânicas incluindo a diferenciação de isômeros são os métodos cromatográficos como a cromatografia gasosa e a líquida e os espectroscópicos como a ultravioleta visível (UV-Vis), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (NMR) e a espectrometria de massas (MS) (MELECCHI, 2005).

3.4.1. Espectroscopia no Infravermelho

A região espectral do infravermelho (IV) abrange uma radiação com número de onda de 12.800 a 10 cm^{-1} que é comumente dividida de acordo com as aplicações e instrumentação em três regiões: radiação no infravermelho próximo, médio e distante (SKOOG et al. 2002).

3.5. Compostos Fenólicos

As plantas são ricas em compostos fenólicos que são divididos em dois grupos distintos, de acordo com o metabolismo, em primários e secundários (NIERO et al. 2003). Os metabólitos primários são encontrados em todos os sistemas vivos e são essenciais ao crescimento e a vida, como os aminoácidos, os carboidratos, os lipídeos, entre outros. Os metabólitos secundários são produtos de metabolismo específico, com distribuição em todas as partes dos vegetais e caracterizados por uma grande diversidade de estruturas químicas. (NODARI; GUERRA, 2000; NIERO et al. 2003).

Metabólitos secundários, como terpenóides, carotenóides, ácidos fenólicos, flavonóides, fitoesteróis, cumarinas, antraquinonas, e alcalóides são sintetizados em diferentes vias metabólicas através de contínuas transformações bioquímicas. Nos vegetais, estes compostos possuem como função: a proteção contra predadores e radiação ultravioleta; a participação nos processos de alelopatia em outras espécies e nos processos de detoxificação; regulação do crescimento e atrativos para agentes polinizadores. (HERRMANN; WILLENS; JANKE, 2001; RON; WILLS; MORGAN, 2000; SIMÕES et al. 2000).

Dentre os metabólitos secundários estão os compostos fenólicos. Estes possuem um ou mais grupos hidroxila (OH) ligados a um anel aromático, podendo ter vários grupos substituintes, como carboxilas, metoxilas, outras estruturas cíclicas não aromáticas, entre outras (NYCHAS, 1995; CASTRO et al. 2004). Com base em sua estrutura e na forma como os anéis fenólicos ligam-se entre si são classificados em fenóis simples, ácidos benzoicos,

ácidos cinâmicos, estilbenos, flavonóides, biflavonóides, taninos, ligninas, entre outras, como mostra a Tabela 4 (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Tabela 4: Classes e estruturas químicas dos compostos fenólicos

Classes	Estrutura química
Fenóis simples	C_6
Ácidos benzoicos	C_6-C_1
Acetofenonas, Ácidos fenilacéticos.	C_6-C_2
Ácidos cinâmicos	C_6-C_3
Naptoquinonas	C_6-C_4
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides, Isoflavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lignanas	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados ou proantocianidinas	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Fonte: Balasundram; Sundram; Samman (2006).

Os principais compostos fenólicos comumente encontrados em vegetais superiores podem ser classificados em várias classes de acordo com tipo e número de anéis fenólicos, e em subclasses de acordo com substituições específicas na estrutura básica, associações com carboidratos e formas polimerizadas. Em uma das classes, encontram-se os compostos não flavonóides e são incluídas as subclasses dos ácidos benzoicos (ácido gálico, ácido protocatéico, ácido phidroxibenzóico), dos ácidos hidroxicinâmicos (ácido cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico), dos taninos hidrolizáveis, da lignina, entre outras. Em outra classe estão incluídos os compostos flavonóides, a exemplo de flavononas, proantocianinas, antocianidinas, isoflavonas (FARAH e DONANGELO, 2006).

Uma das principais características dos compostos fenólicos é a sua capacidade antioxidante, no entanto estudos têm demonstrado sua atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus (ALMAJANO, 2008).

Os resultados observados em relação à atividade antimicrobiana de compostos fenólicos, ao longo dos últimos 30 anos, ainda não foram totalmente esclarecidos. De acordo com Wen et al. (2003), um efeito bactericida dos ácidos hidroxicinâmicos em *L. monocytogenes* em pH 4,5 e um efeito bacteriostático em meios com pH mais elevados. As diferenças nos resultados obtidos ao longo dos últimos anos podem ter sido influenciadas por fatores tais como: diferenças na metodologia experimental, composição do meio,

microrganismos empregados, concentrações investigadas, baixa solubilidade de muitos compostos fenólicos, dentre outros.

3.6. Atividade Antioxidante

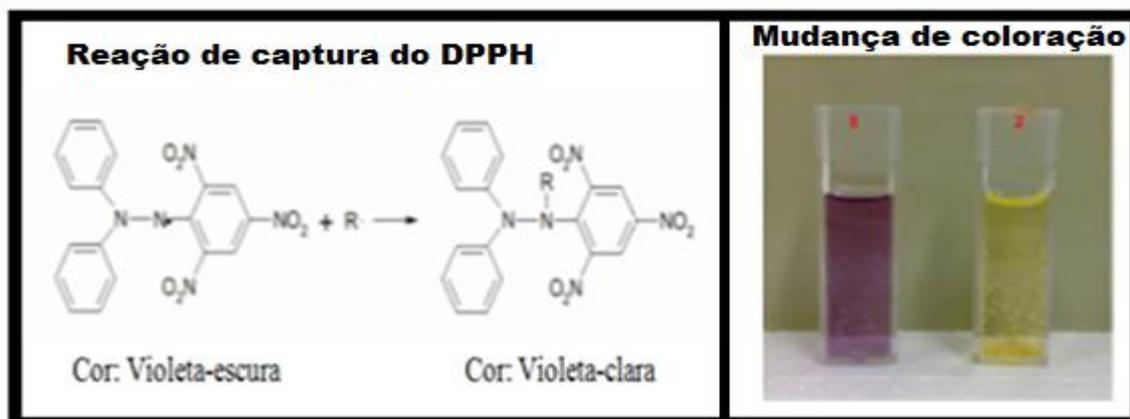
A necessidade de metodologias mais simples e baratas no desenvolvimento de novos métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante ou quantificação de antioxidantes específicos em matrizes complexas como extratos vegetais, frutas e alimentos em geral, pode ser justificado pela relevância comercial e farmacológica destes aditivos (PALANISAMY et al. 2011).

Sabe-se que os componentes antioxidantes, que não apenas vitaminas e minerais, contribuem na proteção oferecida por frutas e vegetais ao dano oxidativo. Desta forma, a capacidade antioxidante total de extratos vegetais não traduz precisamente, o que ocorre *in vivo* nas células vegetais, já que nestas há uma atividade dinâmica de um sistema antioxidante formado por enzimas (superóxido dismutase, catalase, ascorbato redutase, etc) e compostos de baixo peso molecular, tais como flavonóides, taninos, ácidos cinâmicos, ácido ascórbico, tocoferol, antocianinas, entre outros (NEILL et al. 2002).

As condições ambientais podem influenciar na produção destes fitoantioxidantes tais como elevada radiação, temperatura, desequilíbrio mineral ou mesmo ataques patogênicos (NEILL et al. 2002; WILMES et al. 2011).

Por outro lado, em determinadas situações antioxidantes podem agir como pró-oxidantes. Como exemplo, antioxidantes que inibem peroxidação lipídica podem acelerar dano oxidativo a DNA, proteínas e carboidratos (MARKUS; MORRIS, 2008). Sendo assim as atividades antioxidantes de derivados vegetais têm sido avaliadas por diferentes métodos como os colorimétricos que relacionados à habilidade dos antioxidantes em neutralizar radicais como o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila); (Figura 5) ou ABTS (sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina6-sulfônico)), os biológicos que avaliam a capacidade do antioxidante na proteção a peroxidação lipídica, oxidação proteica e também a medida do consumo de oxigênio em emulsões com oxidação lipídica iniciada por metamioglobina, os eletroquímicos que correlacionam potenciais de oxidação, intensidade de corrente ou outros parâmetros eletroquímicos correlacionáveis à capacidade antioxidante, dentre outros métodos instrumentais. (HOTTA et al. 2001; BLASCO et al. 2004; MORIMITSU; OKAZAKI, 2009).

Figura 5: Atividade Antioxidante



Legenda: Reação de captura do DPPH (A) e Mudança de coloração (B)

3.7. Atividade Antimicrobiana

Ao longo das últimas décadas, o avanço da indústria farmacêutica levou ao surgimento de diversos antimicrobianos, com espectro de ação cada vez mais amplo. Entretanto, a exposição aos antibacterianos desencadeou resistência bacteriana, limitando as opções terapêuticas dos processos infecciosos (CUNICO et al. 2004). A resistência a drogas de patógenos humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (DUARTE, 2006).

No entanto, os produtos naturais têm sido fontes valiosas para o desenvolvimento desses novos compostos (NEWMAN; CRAGG; 2007), permitindo a descoberta de agentes terapêuticos não somente para tratar doenças infecciosas, mas também para tratar o câncer, imunodeficiência e outras (CLARDY; WALSH, 2004). Extratos e óleos essenciais de plantas mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias.

Acredita-se que a maioria dos óleos essenciais exerce seu efeito antimicrobiano através de modificações na estrutura da parede celular do microrganismo. Mas especificadamente, altera a permeabilidade de membrana citoplasmática pela modificação no gradiente de íons hidrogênio (H⁺) e potássio (K⁺), causando a interrupção dos processos essenciais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, etapas da fosforilação e outras reações dependentes de enzimas, resultando em perda do controle

quimiosmótico da célula afetada e, conseqüentemente, a morte bacteriana (DORMAN; DEANS, 2000).

A atividade antimicrobiana pode ser determinada *in vitro* através de dois métodos principais: diluição para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e/ou de difusão em disco para determinar a susceptibilidade antimicrobiana (ALVES et al. 2008). O pH, a composição do meio, a estabilidade do composto, a concentração do inóculo e a atividade metabólica dos microrganismos são fatores que afetam todos os métodos *in vitro* aplicados para determinar a atividade antimicrobiana (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

De acordo com as características da parede celular, as bactérias podem ser classificadas em Gram-positivas ou Gram-negativas. As diferenças entre esses grupos são baseadas principalmente nas suas propriedades de permeabilidade nos componentes de superfície (JAY, 2005).

As bactérias que mais provocam mortes no mundo são *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), *Staphylococcus aureus* vancomicina-resistente (VRSA) e a *Escherichia coli*, visto que são resistentes a múltiplas drogas. Os processos infecciosos causados por esses micro-organismos geralmente estão associados com alta letalidade e altos custos de tratamento (ROCHA et al. 2011). As infecções humanas que tem como alvo a pele e mucosa constituem um problema sério, principalmente nos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais. Os patógenos mais frequentes em doenças infecciosas são os dermatófitos (*Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*) e os fungos do gênero *Candida spp* (GURGEL et al. 2005; MEDEIROS et al. 2009).

Assim, serão foco deste estudo as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), as Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter spp* e *Salmonela typhi*) e do fungo *Candida albicans* que serão descritas a seguir:

- O *Staphylococcus aureus* está amplamente distribuído na natureza e encontrado principalmente na região da pele, nasofaringe e fossas nasais. É o agente mais comum de intoxicação alimentar, provocada pela ingestão de enterotoxinas previamente formadas no alimento contaminado. Esta bactéria tem despertado a atenção das indústrias alimentícias pela resistência a altas temperaturas, a desinfetantes e a soluções anti-sépticas, além de apresentar elevada capacidade em desenvolver resistência a diversos antibióticos ativos contra bactérias Gram-positivas (FORSYTHE, 2002).

- O *Escherichia coli* é a espécie bacteriana mais comumente isolada nos laboratórios clínicos e já foi associada a doenças infecciosas envolvendo todos os tecidos e sistemas orgânicos humanos. Esta bactéria pertence ao grupo dos coliformes fecais e indica a contaminação de alimentos durante ou no pós-processamento. Pode causar reações indesejáveis nos produtos alimentícios e possui várias linhagens que são patogênicas para o homem e para os animais (FORSYTHE, 2002).

- O *Salmonella typhi* possui uma ampla variedade de espécies, compreendendo mais de 2300 variedades sorológicas. A patogenicidade deste gênero varia de acordo com o tipo sorológico da bactéria, idade e estado imunológico do hospedeiro. Existem algumas síndromes clínicas associadas a este gênero: gastroenterite, infecção fecal do endotélio vascular e febre tifoide (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SCHAECHTER et al. 2002).

- *Enterobacter* spp. são facultativamente anaeróbia bacilos Gram-negativos, 0,6-1 um em diâmetro e 1,2-3 uM de comprimento, móveis por meio de flagelos peritricosos e tem uma classe fímbrias. Eles produzem ácido mediante fermentação da glicose.

Particularmente conhecidos como *E. aerogenes* e *E. cloacae*, têm sido associados a surtos nosocomiais, e são considerados patógenos oportunistas. Podem causar numerosas infecções, incluindo abscesso cerebral, pneumonia, meningite, septicemia, e ferida no trato urinário (particularmente relacionados com o cateter ITU), e a cavidade abdominal / infecções intestinais (HART, 2006).

A *Candida albicans* são reconhecidas como as leveduras mais usualmente envolvidas na etiologia de infecções micóticas. A candidíase caracteriza-se como a infecção fúngica mais comum, sendo *Candida albicans* seu agente etiológico mais frequente. Ainda, outras espécies inseridas no gênero *Candida* (por exemplo: *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) também podem estar envolvidas na etiologia da candidíase. Os quadros clínicos mais rotineiramente reportados relacionados à candidíase são a do tipo cutâneo-mucosa, sistêmica/visceral e alérgica (LIMA et al., 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Coleta e processamento do material vegetal e processamento do método

Utilizou-se o caule de *C. palanostigma*, coletadas as margens da Rodovia PA 136 município de Terra Alta no estado do Pará tendo como coordenadas S 01°06'49.5" W 047°54'58.5" utilizando o equipamento *Global Positioning System* (GPS) de marca GARMIN etrex 10, com elevação do terreno em relação ao nível do mar de aproximadamente 32 m iniciando as operações no período matutino, no primeiro dia do mês de Novembro de 2012, pelo período da manhã.

Figura 6: Cascas do caule de *Croton palanostigma*



O material foi coletado como mostra a Figura 6 e colocados sobre papel jornal, para retirada da umidade evitando assim a proliferação de fungos.

As cascas do caule da planta foram secas em uma estufa de circulação a 40°C temperatura escolhida para que não houvesse degradação do material, por 72 h tempo necessário para que o material chegasse a um peso constante. Após a remoção da umidade o material foi reduzido a pedaços menores e depois triturado em moinhos de faca tipo Wiley. Após trituração o material passou por uma análise granulométrica e foi pesado obtendo-se uma massa total equivalente a 3,705 Kg como demonstrado na Figura 7. Desse material foram pesadas dezesseis (16) amostras de 100 g, cada uma, das quais quinze (15) foram destinadas ao planejamento experimental para a extração com solvente solido-liquido em um extrator de vidro e uma (01) para a extração com fluido supercrítico.

Figura 7: Material botânico



4.1.2. Solventes e reagentes

Os solventes utilizados foram o álcool etílico P.A. para as extrações. O Folin Ciocateau para a quantificação dos polifenóis totais, o 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e o metanol HPLC para análise da atividade antioxidante.

4.2. Métodos

4.2.1. Determinação da Umidade residual

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição a determinação do teor de umidade pode ser determinada por meio de três métodos distintos o gravimétrico, o azeotrópico e o de Karl Fischer.

Para o trabalho utilizou-se o método gravimétrico com balança por infravermelho consiste em deixar a amostra a ser analisada, já pesada e distribuída uniformemente no coletor de alumínio contido dentro de aparelho; definir o tempo e a temperatura de secagem, acionar o aparelho e anotar o valor da umidade, em percentual, que aparece no display do aparelho. Há uma ressalva para este método em relação às drogas vegetais que contenham óleos voláteis, já que estes podem ser perdidos no processo.

Foi preparada a amostra de forma representativa, homogênea e isenta de impurezas. Foi pesada uma quantidade de aproximadamente 2 g do material a ser analisado, espalhando-o por todo o prato. Ao final de 40 (quarenta) minutos quando um alarme soar, o display indicará o percentual de umidade da amostra. A leitura foi realizada em um analisador de umidade por infravermelho; (modelo IV 2500; de marca Gehaka).

4.2.2. Análise Granulométrica

Um conjunto adequado de peneiras da série Tyler (W.S. Tyler, USA) foi escolhido, pesado e montado. Uma massa de 140 g da amostra foi colocada sobre a primeira peneira e o equipamento ligado operando por 5 min sob agitação *Ro-Tap*. As peneiras foram pesadas novamente para a determinação da quantidade de amostra retida em cada peneira. E acondicionadas em sacos plásticos e protegidos da umidade.

4.2.3. Análise por Infravermelho

Espectro de infravermelho foi obtido em pastilhas de KBr (brometo de potássio) grau espectroscópico, com leituras na região de 4000 a 400 cm^{-1} (espectrômetro Iprestige 21 com transformada de Fourier da Shimadzu com 32 varreduras e resolução de 4 cm^{-1}). Para a análise, foi escolhido o extrato etanólico da ensaio 8 referente a extração convencional por ter apresentado o maior rendimento como mostra a Tabela 10.

4.2.4. Planejamento Experimental da Extração

4.2.4.1. Extração Convencional

O Planejamento fatorial de Box-Behnken (1960) é utilizado quando se deseja otimizar um processo avaliando a sua eficiência, além de requerer um número menor de ensaios experimentais. Possibilita também a detecção da necessidade ou falta de ajustes. No estudo do processo de extração da planta foi utilizado um modelo constituído em três níveis (+1, 0, -1), com três replicas no ponto central, totalizando 15 ensaios.

Foi utilizada a temperatura em graus Celsius, o tempo de extração em minutos e a relação massa fixa de material botânico em gramas, por volume em mL, como variáveis operacionais de entrada (Tabela 2). Estas foram codificadas respectivamente em X_1 , X_2 e X_3 , como demonstrado na Tabela 5 abaixo:

Tabela 5: Variáveis de entrada e seus respectivos níveis

VARIÁVEL REAL (UND)	VARIÁVEL CODIFICADA	NÍVEIS		
		-1	0	1
Temperatura (°C)	X_1	30	45	60
Tempo (min)	X_2	30	60	90
Relação M/S (g/mL)	X_3	1:2	1:4	1:6

M/S: Massa de material botânico (100 g) por volume de solvente (200, 400, 600 mL)

Em todos os ensaios foram mantidos fixos os seguintes fatores: agitação constante 500 rpm e massa de material botânico (100 g).

Os efeitos das variáveis de entrada foram avaliados para as seguintes variáveis de resposta: o rendimento percentual do extrato obtido; Quantificação de polifenóis totais; avaliação da atividade antioxidante e avaliação da atividade antimicrobiana.

Os ensaios experimentais foram efetuados de forma aleatória, no entanto em conformidade com as matrizes de planejamento na Tabela 6:

Tabela 6: Matriz do Planejamento da Extração Convencional

ENSAIOS	VARIÁVEIS CODIFICADAS		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Legenda: T= temperatura; t= tempo; S-L =sólido-líquido; Rd= rendimento.

4.2.4.2. *Extração com CO₂ supercrítico*

No processo de extração com CO₂ supercrítico, foram utilizados um recirculador de ar, (para pressurização do sistema) com um forno elétrico da marca Applied Separactions e uma célula de extração acoplados a um cilindro de CO₂ e a um compressor de ar como mostrados

nas Fotografias 5 e 6 e, todo o processo é demonstrado no Esquema 1. Para a extração foi feito um planejamento experimental levando em consideração as propriedades físicas como, por exemplo, a granulometria e as propriedades químicas como o ponto de fusão do material botânico utilizado, como mostrado na Tabela 7.

Tabela 7: Planejamento de Experimento Supercrítico

ENSAIOS	PRESSAO (bar)	TEMPERATURA (°C)	
		40	60
1	100	-	-
2	200	-	-
3	300	-	-
4	400	-	-

4.2.5. Processo de Extração

4.2.5.1. Extração convencional

Para o processo de extração convencional utilizou-se um extrator tipo tanque agitado encamisado de vidro com um litro de capacidade nominal. A cobertura do extrator possui 3 orifícios, os quais são utilizados um para introdução do agitador mecânico, um para o termômetro e outro era fechado com um bico de vidro (QUIMIS). Como se pode observar na Figura 8, a camisa possui dois orifícios: um inferior por onde entra a água de aquecimento e outro superior que é a saída acoplada a um banho ultra termostático de circulação de fluido (QUIMIS). Para determinar a temperatura interna do extrator, anexou-se um termômetro no mesmo.

O agitador mecânico possui capacidade para até 1000 rpm, e está fixo no suporte do reator e a hélice do agitador é do tipo hélice marinha com 3 pás como demonstrado também na Figura 8. O agitador era sempre colocado no centro do reator para obter a melhor simetria e reprodutibilidade possível. Sempre que era observada a vibração lateral do agitador, após a montagem do equipamento, faziam-se regulagens no sistema com a finalidade de minimizar estas vibrações.

Extração é um procedimento que objetiva a separação e purificação de substâncias orgânicas. Essa técnica é baseada na solubilidade dos compostos, que variam de acordo com o

solvente utilizado na análise. O solvente escolhido foi o etanol, devido à sua polaridade, não ser tóxico, baixo custo e facilidade de evaporação (uma vez que seu ponto de ebulição é baixo).

Figura 8: Equipamentos da Extração Convencional



Legenda: (A) Sistema extrator de vidro e banho termostático, (B) Agitador e (C) Hélice do agitador.

Após a montagem do extrator e o acoplamento do mesmo no banho termostático e agitador, os procedimentos a seguir foram realizados:

- O material botânico e solvente (etanol) foram adicionados ao extrator, seguindo o planejamento padrão;
- A temperatura e o tempo foram ajustados também de acordo com a matriz.
- O sistema é fechado. O agitador é ligado;
- Após o tempo de extração da amostra se esgotar, o extrato é retirado e separado da torta através de uma filtração simples;
- A solução filtrada é colocada em uma vidraria limpa, seca e posteriormente pesada;
- A torta é novamente coberta por um papel alumínio e reservada.

É válido lembrar que, o banho de aquecimento é acoplado ao reator, para que ocorra um débil e suave fluxo de circulação interna do fluído.

E também, que o sistema é devidamente ligado, quando a temperatura (definida pela matriz de planejamento) é atingida, sendo controlada pelo sistema de resfriamento/aquecimento.

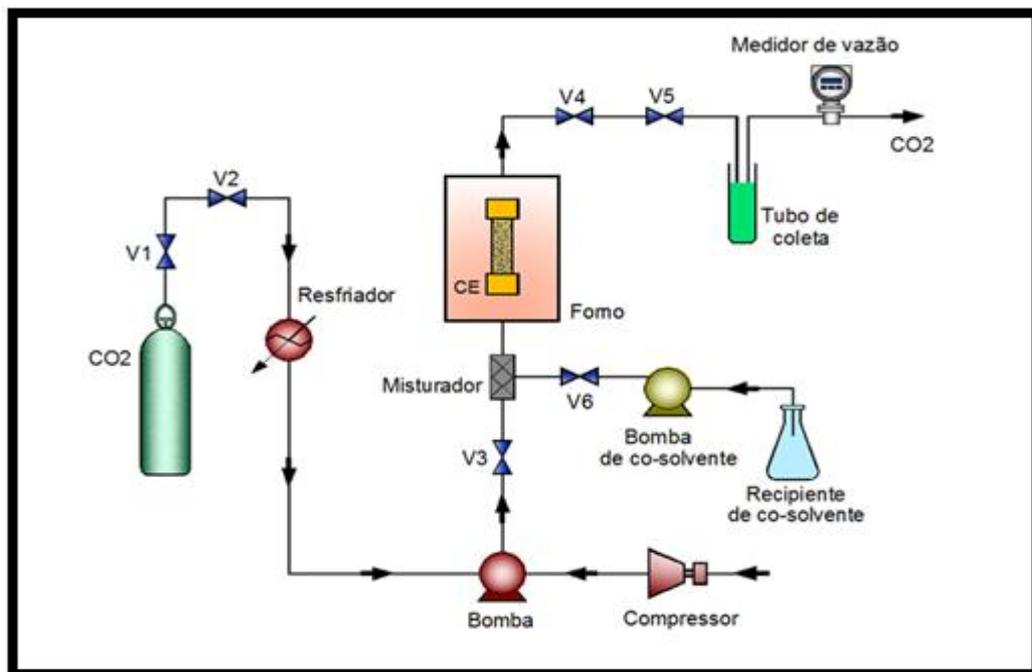
As amostras foram pesadas na balança analítica (BEL Engineering, modelo M214A) e foram armazenados em recipientes de vidro com tampas.

O tempo de evaporação do solvente variava de amostra para amostra (não existia um padrão), isso possivelmente ocorreu, devido as variáveis descritas pela matriz experimental.

4.2.5.2. Extração com fluido supercrítico

Para a extração SFE empregou-se um equipamento de bancada e se desenvolve como demonstra no fluxograma da Figura 9:

Figura 9: Fluxograma do processo de extração supercrítica



Fonte: PINTO (2016)

A extração da *C. palanostigma* foi realizada na unidade de extração mostrada na Figura 10 (Spe-edTMSFE, modelo 7071 da Applied Separations, Allentown, PA, EUA), com compressor (Schulz modelo CSA 7,8 acoplado, com volume interno de 19,7 L da Schulz S/A, Joinville, SC, Brasil), cilindro contendo CO₂ com 99.9% de pureza da White Martins (Belém, PA, Brasil), recirculador com co-solvente (álcool etílico) (Polyscience F08400796 Nilles, Illinois, EUA) (Figura 11) e medidor de vazão na saída do sistema (Alicat Scientific M 5SLPM Tucson, AZ, EUA). Os ensaios experimentais foram realizados no laboratório de

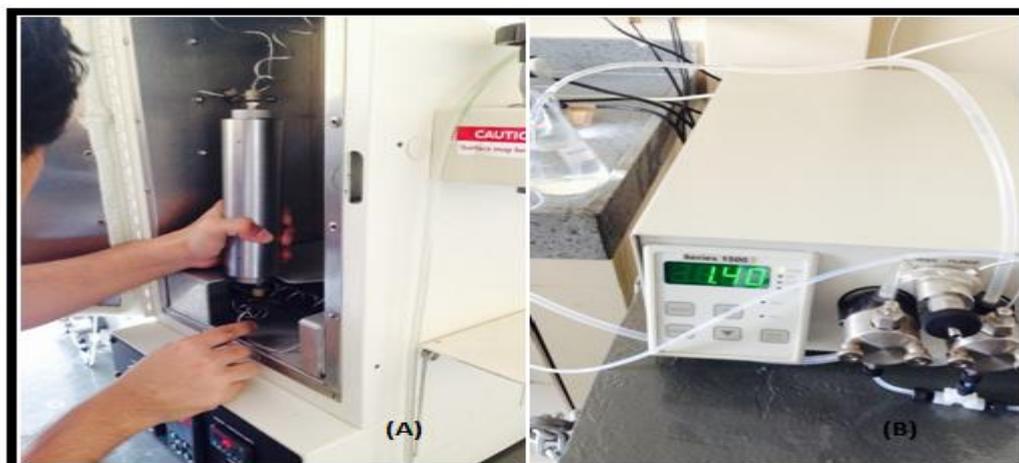
extração, localizado no Laboratório de Ciência, Tecnologia e Engenharia de Alimentos da UFPA.

Figura 10: Unidade de Extração Supercrítica



Legenda: Cilindros de CO₂ (A) e Sistema para extração montado (B)

Figura 11: Equipamentos utilizados na Extração Supercrítica



Legenda: Cilindro metálico colocado no forno (A) e Vazão do etanol (B)

O experimento foi realizado no Laboratório de extração (LABEX), seguindo o planejamento experimental específico, conforme visualizado na Tabela 6, na qual as variáveis utilizadas foram pressão (100, 200, 300, 400 bar) e temperatura (40 e 60°C). A quantidade de amostra utilizada foi de 34,57 g para a extração de 40°C e 15g para a extração de 60°C e o tempo de extração foi para ambos de 60 min, sendo que a cada 60 min se retirava uma amostra e aumentava a pressão em mais 100 bar.

Procedimento de extração:

Após acoplar o tubo de ensaio (que acolherá o extrato) a dois conectores (um de entrada para o solvente e outro para entrada de gás carbônico) ao lado do forno, Foi separado 4 tubos de ensaio.

- A válvula de aquecimento é ligada (para não haver congelamento de CO₂).
- A temperatura do circulador é ajustada para -10°C.
- Foram pesados, 30 g do material botânico, que foi adicionado posteriormente em um cilindro e o mesmo que foi colocado em um forno.
- A vazão do solvente (etanol) foi ajustada para 1,4 mL/min.
- Após a temperatura ser atingida, o equipamento foi ligado.
- A temperatura, a pressão e o tempo foram ajustados de acordo com a matriz.
- Após o tempo de extração se esgotar, o extrato é retirado e separado da torta.
- A solução extraída foi colocada em uma vidraria seca e pesada.
- Repetiu-se o procedimento, para as pressões de 200, 300 e 400 bar (segundo a matriz de planejamento- após 1 h).

É válido lembrar que o CO₂ tinha de entrar no circulador, na forma líquida, uma vez que no equipamento existe um pistão e se o gás carbônico estivesse na forma gasosa, o pistão poderia ser danificado. Logo o gás em análise será condensado.

O tubo metálico foi colocado no forno e conectado por dois tubos que tinham função de entrada e saída para o gás CO₂.

Os extratos obtidos foram submetidos à rota evaporação para que todo o solvente ainda existente nos extratos fosse evaporado. Utilizou-se o aparelho evaporador rotativo (destilação à vácuo) como demonstrado na Figura 12, da marca Heidolph, que é constituído de um frasco de destilação e um frasco coletor, ambos de fundo redondo; duto de vapor; condensador em espiral com entrada e saída para líquido refrigerante e do vácuo e torneira de vedação, além do banho de aquecimento e da unidade de rotação. Usa-se também uma unidade de geração de vácuo.

Figura 12: Destilação em rota evaporador em funcionamento



4.2.6. Cálculo do rendimento do extrato etanólico

Para o cálculo do rendimento da extração do extrato a base de álcool etílico PA, a partir das cascas do caule do *C. palanostigma*, em base seca (a umidade ainda existente no material foi subtraída da massa bruta para realizar os cálculos do rendimento), foi utilizada a seguinte Equação 4:

$$Rd(\%) = \frac{M_0}{M} 100 \quad 4$$

Onde,

Rd|: rendimento da extração (%);

M₀: massa do extrato (g);

M: massa da matéria-prima em base seca (g)

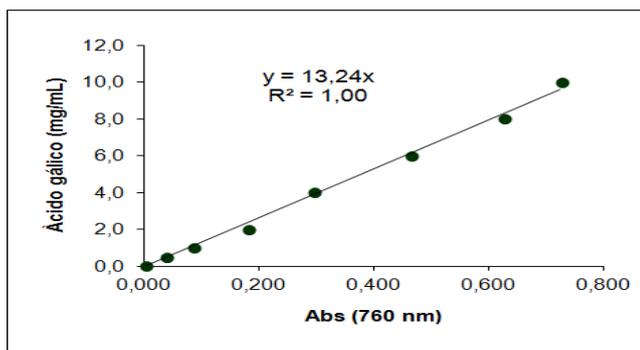
Com a obtenção dos extratos oriundos da extração convencional e da extração supercrítica foram realizadas a quantificação de polifenóis totais, avaliação da atividade antioxidante e da atividade antimicrobiana.

4.3. Quantificação de Polifenóis Totais

Os compostos fenólicos totais foram quantificados através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (GUTFINGER, 1981) com algumas alterações, utilizando o ácido gálico como padrão de referência (Figura 13). Todas as análises foram

realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por g de peso seco da amostra (mg EAG/g). A determinação dos polifenóis totais, por reação com o reagente de Folin-Ciocalteu, baseia-se no princípio de que, em meio alcalino, os fenóis reduzem a mistura dos ácidos fosfotungstico e fosfomolibdico a óxidos de tungstênio e molibdênio de cor azul (GUTFINGER, 1981).

Figura 13: Calibração com Ácido Gálico para o teste de quantificação de polifenóis totais



Onde

R^2 : Coeficiente de determinação

Abs: Absorbância do extrato

As análises de polifenóis totais foram realizadas no laboratório de Engenharia de Produtos Naturais - LEPRON, do Laboratório de Engenharia Química da Universidade Federal do Pará.

4.3.1. Extrato obtido convencionalmente

Foi preparada uma solução mãe de cada uma das 15 ensaios com 10 mg do extrato bruto para 1 mL de etanol, que por sua vez foi diluída 50 vezes da seguinte maneira: foram transferidos 0,01 mL da amostra, 0,49 mL de água destilada, 0,25 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 1,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio formando uma mistura de cor azul. Após 30 min foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 760 nm, (UV-Vis, Quimis).

4.3.2. Extrato obtido pela extração supercrítica

Foi preparada uma solução mãe de cada uma das 8 ensaios com 10 mg do extrato etanólico para 1 mL de etanol, para estas soluções as diluições foram específicas, as mesmas

tiveram diluições diferentes indicadas na Tabela 8, foram transferidos 0,01 mL da amostra, 0,49 de água destilada, 0,25 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 1,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio formando uma mistura de cor azul. Após 30 minutos foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 760 nm, (Quimis).

Tabela 8: Fator de diluição das soluções do supercrítico

ENSAIOS	FATOR DE DILUIÇÃO	
	40° C	60° C
1	200x	100x
2	100x	100x
3	100x	100x
4	120x	20x

4.4. Avaliação da Atividade Antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada utilizando o cromóforo DPPH, técnica esta que se baseia no método de Cavin et al. (1998) e Bouchet et al. (1998). Para realização do ensaio, preparou-se uma solução de DPPH (1,137 difenil-2-icrilhidrazil) 0,6 mM momentos antes do uso. A leitura foi feita no espectrofotômetro UV-Vis, em 517 nm. Primeiro determinou-se a absorbância do controle (AC) medindo-se a absorbância da mistura de 1,95 mL de DPPH 0,6 mM (que é violeta) e 0,5 mL de metanol, logo após, da absorbância do branco que consiste de 0,5 mL do extrato e 1,95 mL de metanol. Analogamente, a cada uma das soluções dos extratos em análise (0,5 mL), foram adicionados 1,95 mL de DPPH. Após 30 minutos iniciaram-se as medidas de absorbância. O teste é feito em triplicata. A IC₅₀, concentração necessária para se alcançar 50 % de decréscimo na absorbância do DPPH, é obtida a partir do gráfico de percentagem de DPHH em função da concentração do extrato (Figura 1). A atividade antioxidante foi determinada em termos porcentagem de reação segundo a Equação 5. A IC₅₀ determina que quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua IC₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al, 2007).

$$\% \text{inibição} = \left[\frac{(AA - AB)}{AC} \right] \times 100 \quad 5$$

Onde:

AA: Absorbância da amostra;

AC: Absorbância do controle negativo;

AB: Absorbância do branco

Preparo da solução de DPPH 0,06 mM utilizado na análise

Diluir 2,4 mg de DPPH em álcool etílico e completar o volume para 100 mL em um balão volumétrico com álcool etílico, homogeneizar e corrigir se necessário a molaridade, transferir para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado.

Extrato obtido pela extração convencional

Foi preparada uma solução mãe de cada uma das 15 ensaios com 20 mg do extrato bruto para 1 mL de etanol, foram transferidos 0,05 mL da amostra, 1,95 de solução de DPPH 0,06 mM, a leitura da absorbância em espectrofotômetro, marca Quimis, a 570 nm nos tempos de 15min, 30 min, 45 min e 60 min.

Extrato obtido pela extração supercrítica

Foi preparada uma solução mãe de cada uma das 8 ensaios com 20mg do extrato bruto para 1 mL de etanol, foram transferidos 0,05 mL da amostra, 1,95 mL de solução de DPPH 0,06mM, a leitura da absorbância em espectrofotômetro, marca Quimis, a 570 nm nos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos.

4.5. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Para os testes da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Staphylococcus aureus*, ATCC 29213; e *Salmonella spp.* ATCC 14029, *Enterobacter spp.* ATCC, *Candida albicans* ATCC 1009, *Escherichia coli* ATCC 8739, obtidas da FIOCRUZ/Laboratório Central do Estado do Pará (LACEN-PA).

As cepas ATCC foram semeadas em meios de cultura específicos para cada microrganismo, sendo o Ágar Sabouraud para *Cândida albicans*, Ágar Nutriente para

Salmonella ssp e *Enterobacter*, Ágar McConkey para *Escherichia coli*, Ágar Manitol para *Staphylococcus aureus*. Posteriormente as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h, no caso das bactérias, e 25°C por 48 h no caso do fungo, para então serem utilizados nos experimentos.

Preparo dos meios de cultura

Ágar Sabouraud Dextrose, Ágar MacConkey, Ágar Nutriente, Ágar Manitol, Ágar Müller Hinton e Caldo Müller Hinton, os quais foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5.1. Método de microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As amostras foram submetidas ao teste de microdiluição, para a determinação da concentração inibitória mínima CIM (ELOFF, 1998), utilizando-se as seguintes concentrações: 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,5 µg/mL por poço.

Foi preparada uma suspensão de cada cepa em caldo Müller Hinton, ajustando-se a turbidez com o tubo 0,5 da escala de Mac Farland (CLSI, 2009). Em placas de 96 cavidades, conforme demonstrado na Figura 14, foram depositados 180 µL de caldo Müller Hinton, adicionando-se uma alíquota de 10 µL das amostras, e respectivas diluições, e 10 µL das suspensões bacterianas, totalizando 200 µL em cada poço.

Como controle positivo para os ensaios de concentração inibitória mínima e de concentração bactericida mínima foi utilizado gentamicina. Para o controle negativo se utilizou 10 µL da suspensão bacteriana + 190 µL de caldo Müller Hinton em 3 poços e em outros 3 poços 10 µL da suspensão bacteriana + 190 µL de Etanol 70% cada amostra testada em triplicata (CLSI, 2009).

De acordo com Rodrigues (2013), a utilização de etanol 70% não inibe o crescimento microbiológico, desta forma pode-se utilizar este solvente como controle negativo no experimento.

Após o semeio, as placas foram cobertas com parafilme e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 h. Depois do período de incubação, acrescentou-se à placa de teste da CIM, 10 µL de uma solução de sal de tetrazolio (MTT) (2 mg/mL), sendo que a placa foi novamente incubada por 4 horas. O MTT é um sal de tetrazolio, que possui coloração

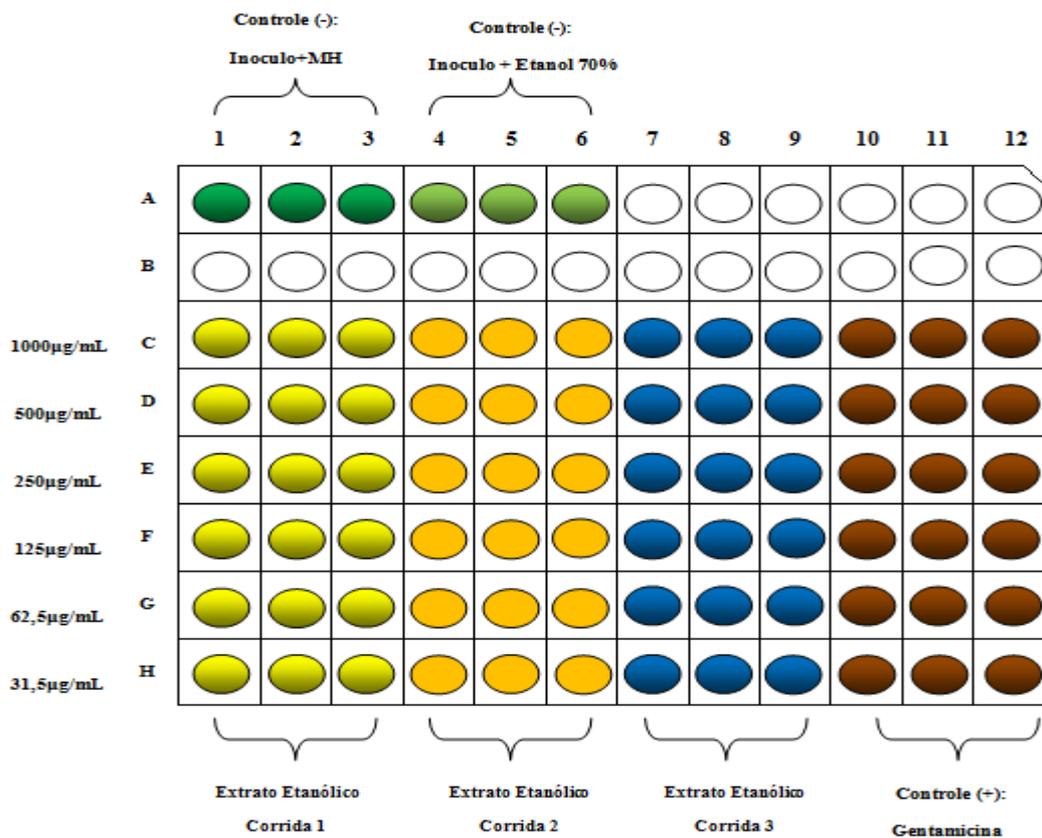
inicial e amarela, no entanto em células viáveis esse sal e reduzido a formazan, que apresenta coloração azul.

Após a inserção de MTT se realizou a leitura colorimétrica, determinando que a cor azul indique crescimento bacteriano e a cor amarela que não houve crescimento bacteriano sendo assim considera-se que a menor concentração do subgrupo em que não houve crescimento será considerada a concentração inibitória mínima (MONSMANN, 1983, TAVEIRA, 2007).

Para a classificação da atividade antimicrobiana bacteriostática do extrato e suas frações foram adotados os seguintes parâmetros: amostra com alta atividade antimicrobiana, concentração inibitória mínima (CIM) < 100 µg/mL; quando a CIM está entre 100 a 500 µg/mL foi considerada moderada; CIM entre 500 a 1000 µg/mL esta atividade foi considerada fraca e a amostra foi considerada inativa quando o CIM > 1000 µg/mL (HOLETZ et al. 2002).

O Esquema 2, demonstra como as placas de 96 poços utilizadas para a metodologia de microdiluição foram preenchidas com os controles positivos, controles negativos, as concentrações dos extratos das ensaios em triplicata.

Figura 14: Placa de 96 poços para os testes de Concentração Inibitória Mínima



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1. Estudos Farmacológicos

5.1.1. Determinação da Umidade da do *C. palanostigma*

O teor médio de umidade final das amostras botânicas que foram submetidas à extração convencional e a do supercrítico foi de 11,9% em base seca.

O resultado obtido está de acordo com a pesquisa realizada pela Dr^a Maria Brandão para o dossiê técnico para Produção de chás e extratos de plantas medicinais, produzido pela Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC) em 2007, onde indica que as faixas de teor de umidade adequada para material botânico, descrevendo que a faixa de 8 a 14 % são para casca do material botânico, pois uma vez que uma porcentagem de umidade superior pode causar deterioração por contaminação microbiana e transformações químicas dos metabólitos secundários.

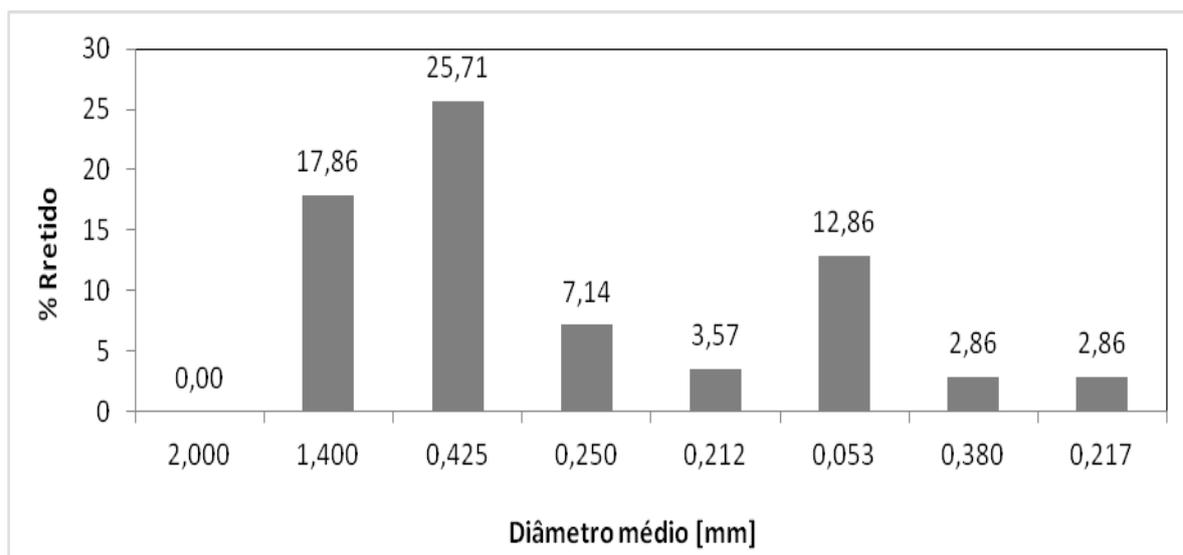
5.1.2. Análise Granulométrica da Casca do *C. palanostigma*

As peneiras Tyler utilizadas tinham as seguintes especificações 10, 14, 35, 60, 65, 270 e 400 mm além do coletor para determinar as faixas granulométricas. Os valores obtidos foram aplicados na Equação 1, após os cálculos procedeu-se a classificação e distribuição granulométrica que está apresentado na Tabela 9 e Figura 15 respectivamente.

Tabela 9: Dados utilizados para os cálculos do Diâmetro médio de Sauter

TYLER	MASSA RETIDA (g)	PERCENTUAL DE MASSA RETIDA (%)
10	38	27,14
14	25	17,8
35	36	25,71
60	10	7,14
65	5	3,57
270	18	12,86
400	4	2,86
-400	4	2,86
TOTAL	140	100,00

Figura 15: Gráfico da Distribuição Granulométrica do pó da casca do *Croton palanostigma*



Aplicando os valores obtidos com a análise distribuição granulométrica na Equação 1, obteve-se um diâmetro médio de Sauter das partículas de 1,15 mm. O material foi classificado de acordo com a Farmacopeia Brasileira V (2010) como pó grosso que é aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis de abertura nominal de malha 1,70 mm e, no máximo, 40% do tamis com abertura nominal de malha de 355 μm .

Pelos resultados apresentados percebe-se que as faixas em que a casca de *C. palanostigma* ficou mais retida foi 0-10 a 14-35, representando 27,141% e 25,71%, respectivamente.

A avaliação granulométrica do material é uma etapa importante da padronização, pois representa uma influência direta sobre a eficiência no processo extrativo. Partículas com dimensões homogêneas aumentam a área de contato entre o material sólido e o líquido extrator, podendo tornar, desta forma, mais eficiente a operação de extração (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

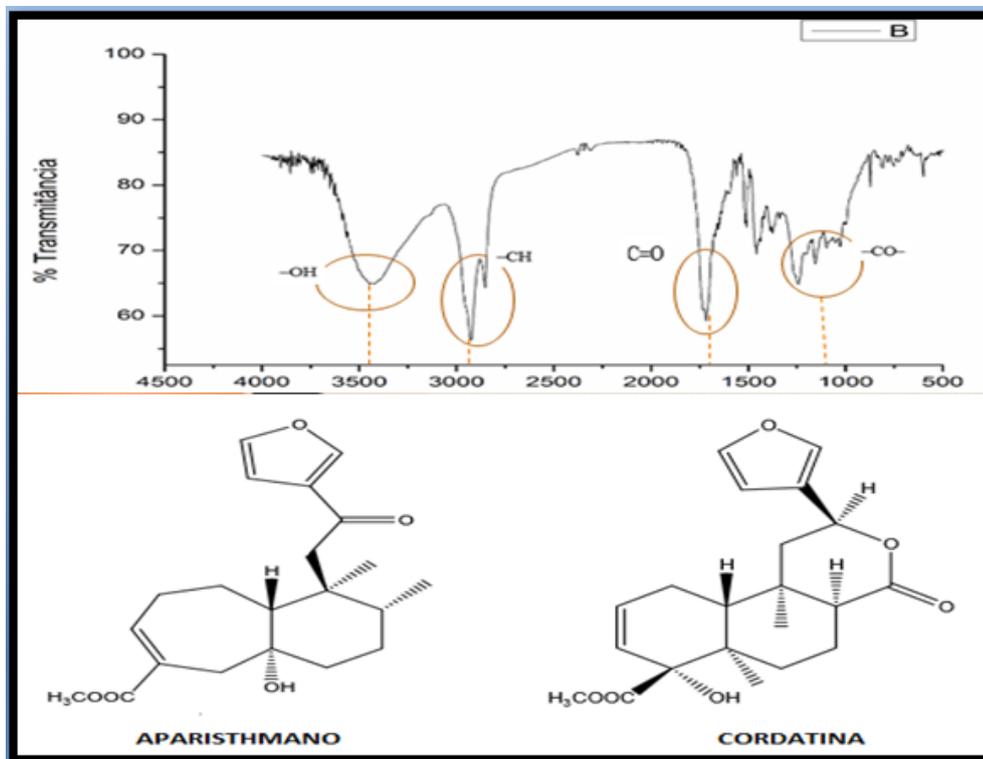
5.2. Estudos Fitoquímicos

5.2.1. Infravermelho

No presente estudo, para as análises por espectrometria no IV, observa-se o estiramento da ligação O-H (3500 cm^{-1}), estiramento da carbonila (1750 cm^{-1}). Dos anéis furânicos observa-se as bandas de absorção próximas a 3000 , 1750 e 1100 cm^{-1} , os resultados

experimentais obtidos são bem próximos ao observado no estudo teórico de Aparistmano e da Cordatina (BRASIL 2008), concluindo-se que os compostos são característicos da espécie *C. palanostigma* (Figura 16).

Figura 16: Gráfico de Infravermelho da casca do *Croton palanostigma*



5.2.2. Extração convencional

5.2.2.1. Análise do Rendimento

Os ensaios foram realizados de acordo com a matriz de planejamento, onde são apresentadas as variáveis de entrada reais e a resposta rendimento – Rd (%), conforme demonstrado na Tabela 10.

Tabela 10: Valores dos resultados do Rendimento

ENSAIOS	VARIÁVEIS REAIS			RD (%)
	T (°C)	t (min)	S-L (g/mL)	
1	30	30	1:4	4,28
2	60	30	1:4	4,91
3	30	90	1:4	4,58
4	60	90	1:4	5,33
5	30	60	1:2	2,45
6	60	60	1:2	0,92
7	30	60	1:6	3,77
8	60	60	1:6	7,96
9	45	30	1:2	1,17
10	45	90	1:2	3,56
11	45	30	1:6	5,17
12	45	90	1:6	5,65
13	45	60	1:4	4,75
14	45	60	1:4	4,60
15	45	60	1:4	4,79

Legenda: T= temperatura; t= tempo; S-L =sólido-líquido; Rd= rendimento.

Pode-se observar na Tabela 10, que os valores mínimo e máximo rendimento em termos percentuais do *C. palanostigma*, foram 0,91% e 8,85% obtidos, respectivamente, nos ensaios 6 e 8.

As cascas do *C. palanostigma* e utilizando um planejamento experimento de Box-Behnken os ensaios com maior e menor rendimento foram, respectivamente, as dos ensaios 12 (T=40°C; t= 60 min; g/mL: 1:6) e a 9 (T=40°C; t= 30 min; g/mL: 1:2) com 8,15% e 1,63% (DAMASCENO, 2012).

Isso pode ser em decorrência de vários fatores como, por exemplo, período de coleta do material, solvente utilizado ou tempo decorrido entre a coleta e a extração.

Também podemos observar na TABELA 10, que os maiores rendimentos como nos extratos 5 e 12, estão associados com a relação massa/solvente o que nos induz a dizer por este estudo que a quantidade de solvente influencia no processo extrativo.

Modelo Matemático Proposto

Para o estudo do rendimento dos extratos obtidos da casca de *C. palanostigma*, os resultados da análise de regressão múltipla com a indicação dos respectivos coeficientes das variáveis de entrada e suas combinações. O modelo estatístico genérico de 2ª ordem está apresentado conforme polinômio representado na Equação 5 abaixo:

$$Rd = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_1X_1^2 + \beta_2X_2^2 + \beta_3X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 \quad 5$$

Ao processar os resultados e discriminar os coeficientes significativos, substituindo os valores dos respectivos coeficientes, obteve-se a Equação 6 com as variáveis codificadas:

$$Rd = 4,71 + 0,50X_1 + 0,45X_2 + 1,81X_3 - 0,91X_3^2 + 1,42X_1X_3 - 0,48X_2X_3 \quad 6$$

A análise da equação obtida para o modelo permitiu observa que as variáveis X_1 (Temperatura) e X_2 (tempo de extração) apresentaram um efeito positivo indicativo de uma relação diretamente proporcional entre temperatura e tempo de extração com o rendimento, condição que se cumpre para outros métodos de extração convencional (AHMED, 2003).

Outra variável que manifestou efeito positivo foi a X_3 (relação massa/solvente), ela é conhecida entre todos os processos convencionais de extração sólido-líquido como um fator atuante.

A combinação das variáveis X_1X_3 apresentou efeitos positivos indicando que existe uma relação diretamente proporcional entre a temperatura e a relação massa/solvente.

As variáveis, quadrática X_3^2 e as combinadas X_2X_3 não apresentaram efeitos positivos indicando que o rendimento não tem relação direta entre as variáveis, tempo e relação massa/solvente.

Análise dos Efeitos Estimados

Os Efeitos Estimados demonstram os valores estimados estabelecidos pelo Statistic® em relação ao erro padrão mostrando, desta forma, quais as variáveis são significativas para o rendimento demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11: Efeitos Estimados para Rendimento

FACTOR¹	EFEITOS	ERRO PADRÃO
Média	4,14	±0,03
X₁	1,01	±0,07
X ₁ ²	0,02	±0,05
X₂	0,90	±0,07
X ₂ ²	-0,09	±0,05
X₃	3,61	±0,07
X ₃ ²	0,91	±0,05
(X ₁ x X ₂)	0,06	±0,10
(X₁ x X₃)	2,86	±0,10
(X₂ x X₃)	-0,96	±0,10

Legenda: X₁=Temperatura; X₂=tempo; X₃=Relação massa/solvente.

Os efeitos estimados das variáveis isoladas e de suas combinações binárias mostradas na Tabela 10 indicam que as variáveis lineares X₁(Temperatura), X₂ (tempo), X₃ (Relação massa/solvente), a quadrática X₃², e as combinadas (X₁xX₃) e (X₂xX₃), apresentam efeitos significativos para a resposta Rd, devido seu valor absoluto ser menor que o erro em módulo evidenciando que esse não ocorre simplesmente a erros operacionais, mas sim de efeito considerável na resposta devido às modificações em seu nível.

As variáveis X₁, X₂, X₃, X₁², X₃², X₁xX₂ e X₁xX₃, proporcionaram um efeito positivo na resposta, sendo estatisticamente significativa para o rendimento enquanto que as variável quadrática X₂² e a combinada X₂xX₃ se apresentam sendo estatisticamente não significativo para a resposta (Rd) da extração.

Então se pode dizer que se aumentando os níveis, do mais baixo (-1) ao mais alto (+1), das variáveis significativas promove-se um aumento, em média, de 1,01%, 0,90%, 3,61%, 0,91%, 2,86% e -0,96% respectivamente no rendimento da extração convencional, o que é desejável para esta resposta.

Análise de Variância

Para a determinação da significância estatística dos efeitos das variáveis de entrada na resposta Rendimento das extrações convencionais, com mais propriedade, é realizada uma análise de variância (ANOVA) conforme indicado na Tabela 12.

Tabela 12: ANOVA para Rendimento

FATOR DE VARIAÇÃO	SQ	GL	MQ	F	P
X₁	2,05	1	2,05	195,89	0,005
X ₁ ²	0,01	1	0,01	0,21	0,690
X₂	1,62	1	1,62	154,99	0,006
X ₂ ²	0,03	1	0,03	2,87	0,232
X₃	26,09	1	26,10	2497,51	0,0004
X ₃ ²	3,08	1	3,08	294,62	0,003
X ₁ x X ₂	0,01	1	0,01	0,31	0,629
X₁ x X₃	8,17	1	8,17	781,80	0,001
X ₂ x X ₃	0,91	1	0,91	87,51	0,011
Falta de ajuste	1,41	3	0,47	45,17	0,022
Erro Puro	0,02	2	0,01		
Total SQ	43,46	14			

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática; N° de Fisher; p: Análise de probabilidade; X₁=Temperatura; X₂=tempo; X₃=Relação massa/solvente.

A referida tabela mostra os efeitos das variáveis de entrada sobre a resposta na forma linear, quadrática e com termos cruzados, que podem ser avaliados com base no valor de p que indica a probabilidade que cada variável possui de não ser considerada significativa para cada variável, ou seja, estar dentro da região de hipótese nula, ou avaliando o valor de F calculado ($F_{0,5,3,2} = 45,172$) é maior que o valor F crítico ($F_{0,5;3,2} = 19,164$), conforme valor tabelado em Box, Hunter e Hunter (1978), indicando que não há falta de ajuste para o modelo proposto.

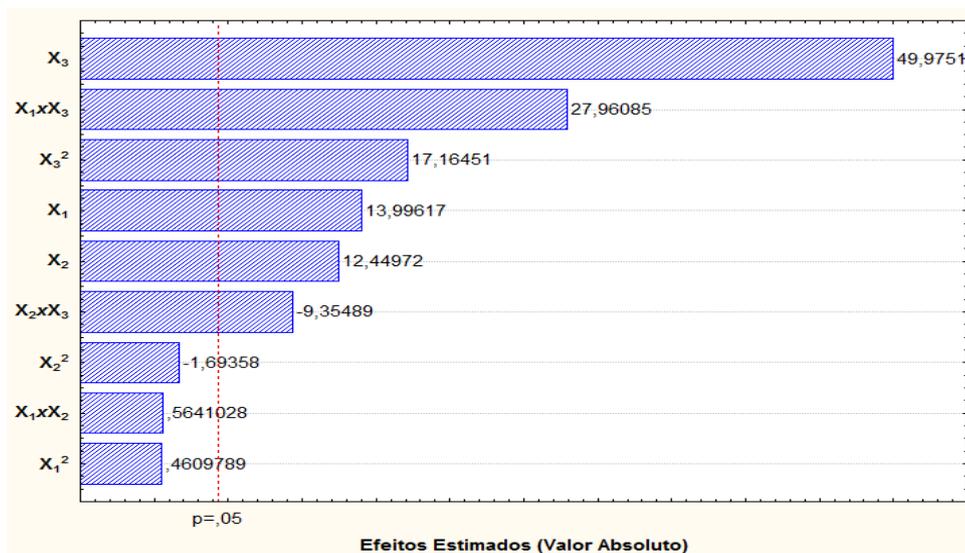
Pelo exame da ANOVA verifica-se que as variáveis de entrada X₁ (T), X₂ (t), X₃ (g/mL) e as combinações (X₁ x X₃) (T x g/mL) e X₂ x X₃ (t x g/mL) são estatisticamente significativas em um nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$). As demais combinações não são estatisticamente significativas para a resposta Rd, ou seja, estão dentro da região de hipótese nula.

O valor de R^2 indica que 96,69% da variância é explicada pela regressão. Este resultado é considerado bastante satisfatório satisfazendo assim o modelo matemático proposto.

Análise do Gráfico de Pareto

A Figura 17 (Gráfico de Pareto) mostra além dos efeitos individuais e combinados em relação à variável resposta também descreve os efeitos estimados padronizados (razão entre os efeitos estimados e o desvio padrão correspondente) que cada variável exerce na resposta avaliada. A linha vertical que corta os efeitos é indicativa do limite de rejeição da hipótese nula ($p = 0,05$), devendo assim ser considerados, para a avaliação da resposta Rd%, apenas os efeitos localizados a direita desta reta.

Figura 17: Gráfico de Pareto para o Rendimento



Legenda: X_1 =Temperatura; X_2 =tempo; X_3 =Relação massa/solvente.

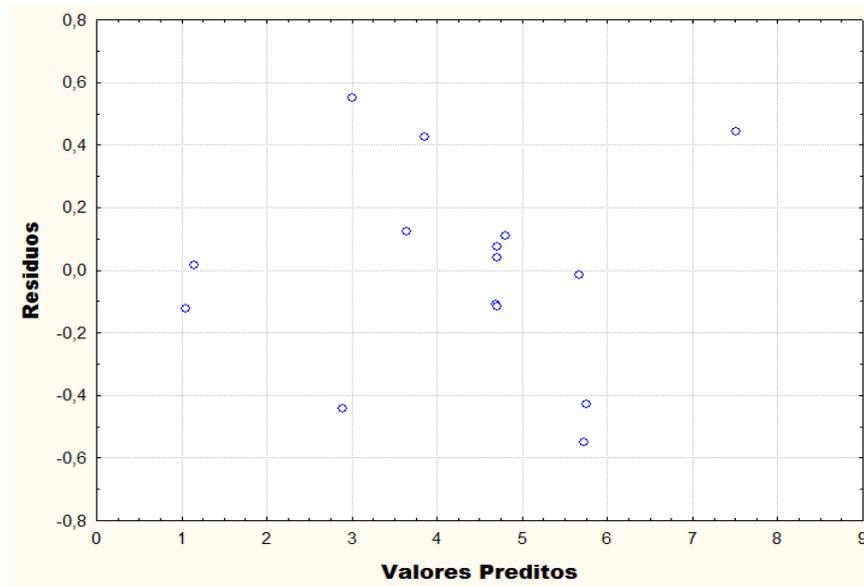
O Gráfico nos mostra que as variáveis isoladas lineares e quadráticas X_1 , X_2 , X_3 , X_3^2 , e as combinadas ($X_1 \times X_3$) e ($X_2 \times X_3$) são significativas, em nível de 95% do limite de confiança, pois essa variável está localizada à direita da reta vertical indicativa do limite de rejeição da hipótese nula ($p = 0,05$).

A variável ($X_2 \times X_3$) em valor absoluto igual a $-9,3548$, apesar de se apresentar como uma variável significativa também possui um efeito negativo, ou seja, dentro do processo ele produz uma redução do rendimento do processo.

Análise dos Resíduos

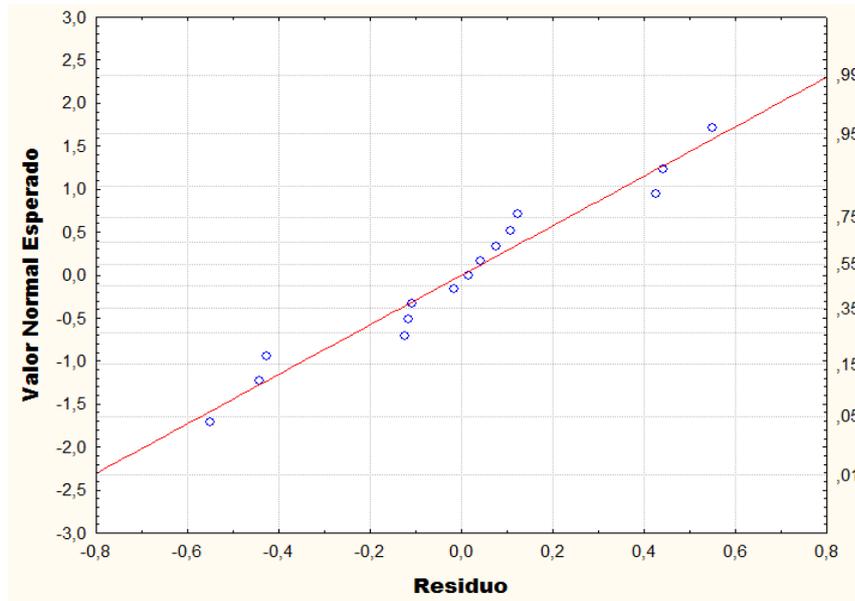
O modelo proposto foi avaliado através da análise dos resíduos como apresentado no Figura 18 que representa a distribuição dos resíduos em função dos valores preditos pelo modelo proposto e que avalia sua amplitude e distribuição em torno do zero, determinando que a distribuição dos resíduos deva ser totalitariamente aleatória, não apresentando desta forma, comportamento tendencioso ou sistemático, o que indica a independência das variáveis de entrada, podemos admitir o que o modelo matemático descreve relativamente bem a equação proposta, já que experimento envolve produtos naturais, os quais envolvem parâmetros de difícil controle e avaliação.

Figura 18: Gráfico da Distribuição dos resíduos para o Rendimento



A Figura 19 mostra que os resíduos seguem uma distribuição de probabilidade normal, ou seja, os pontos encontram-se distribuídos próximos e ao longo de uma reta, o que está de acordo com os pressupostos estatísticos, que devem ser obedecidos para que o modelo de regressão tenha qualidade na previsão dos valores da resposta Rd.

Figura 19: Gráfico do Teste de Normalidade para o Rendimento

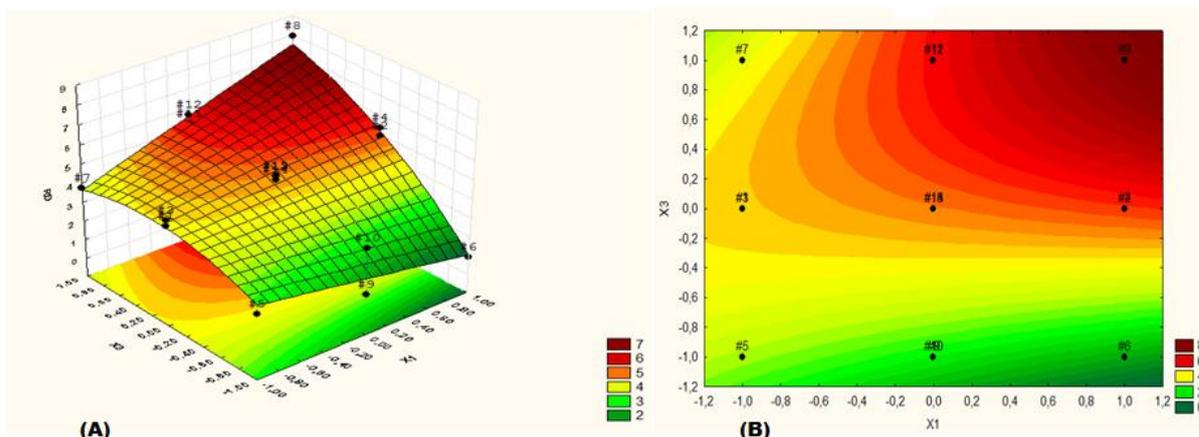


Análise da Superfície de Resposta

Para melhor visualização do ponto ótimo de operação, construíram-se as superfícies de resposta e as correspondentes curvas de níveis ou contornos em função das variáveis codificadas, utilizando-se o aplicativo Statistica®. São graficadas no eixo z a resposta Rd e nos eixos x e y duas variáveis de interesse, mantendo-se a outra no ponto estacionário, como ilustrado na Figura 20.

Desse modo, sabendo se que as variáveis X_3 (g/mL) e X_2 (t), possuem os maiores valores matemáticos significativos para a resposta rendimento, de acordo (Gráfico 3), a construção da superfície de resposta e os contornos será em função de X_3 e X_2 , mantendo-se X_1 (T) fixo no ponto 0 ($X_1 = 0$).

Figura 20: Gráfico da Superfície de Resposta e Curva de Nível para Rendimento



Legenda: Superfície de Resposta (A) e Curva de Nível (B)

Avaliando-se as superfícies de respostas e os contornos indicados na Figura 20(A) e (B) percebe-se com clareza que realmente as condições que propiciam o aumento do rendimento e, portanto, favorecem o processo, correspondem aos valores mais elevados das variáveis $X_1(t)$ e $X_3(g/mL)$ no seu nível máximo (+1), ou seja, $t = 60 \text{ min}$ e $g/mL = 1:6$.

5.2.2.2. Quantificação dos Polifenóis Totais

A quantificação de compostos fenólicos totais encontrados nos extratos obtidos pela extração convencionais podem ser observadas na Tabela 13, os quais foram calculados através da equação de regressão $y = 13x$, ($R^2=1$), obtida pela curva de calibração do ácido gálico (y é a absorbância a 750 nm e x é a concentração em mg de ácido gálico em g de extrato).

Os valores máximos e mínimos calculados foram dos ensaios 4 e 9 com 29,3 e 11,04 mg EAG/g de amostra respectivamente, fazendo uma analogia com o trabalho de Rodrigues (2013) que apresentou os respectivos valores nas ensaios 11($T= 40^\circ\text{C}$; $t= 30 \text{ min}$; $g/mL= 1:6$) e 15 ($T= 40^\circ\text{C}$; $t= 60 \text{ min}$; $g/mL= 1:4$) com 10, e 4,5 mg EAG/g respectivamente. Essas diferenças podem estar relacionadas, por exemplo, ao solvente com polaridades diferentes e ao extrator de materiais distintos, neste estudo foi utilizado etanol e um extrator e um encamisado de vidro e no de Rodrigues (2013), foi utilizado acetato de etila e reator de aço inox.

Tabela 13: Valores dos resultados de Polifenóis Totais

ENSAIOS	VARIÁVEIS REAIS			PT
	T (°C)	t (min)	S-L (g/mL)	mg EAG/g
1	30	30	1:4	11,25
2	60	30	1:4	15,63
3	30	90	1:4	13,10
4	60	90	1:4	11,04
5	30	60	1:2	13,10
6	60	60	1:2	17,73
7	30	60	1:6	13,11
8	60	60	1:6	15,11
9	45	30	1:2	29,35
10	45	90	1:2	14,37
11	45	30	1:6	13,05
12	45	90	1:6	15,99
13	45	60	1:4	14,37
14	45	60	1:4	14,74
15	45	60	1:4	15,96

Legenda: T= temperatura; t= tempo; S-L =sólido-líquido; PT: Polifenóis Totais; EAG= Equivalente Ácido Gálico; mg= miligrama; g= Grama

A metodologia é amplamente empregada para a quantificação de compostos fenólicos em extratos e óleos essenciais obtidas de material botânico, pois os metabólitos secundários presentes em vegetais são a classe que apresentam habilidade maior em doar elétrons e, portanto, são geralmente associadas à capacidade antioxidante que estas espécies podem apresentar. Entretanto estudos mostram que a quantificação desses compostos por este método pode sofrer influência de diversos fatores, ligados diretamente ao método de preparo das amostras ou de extração, ou ainda à presença de substâncias contaminantes, como pigmentos, resinas, entre outros, que também podem reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu, produzindo resultados falso positivo, ou que superestimem a quantidade de fenóis no meio. (ANGELO; JORGE, 2007). Mesmo assim ainda é uma técnica

espectrofotométrica bastante utilizada, sendo constantemente revalidada para comprovar sua eficácia. (OLIVEIRA et al., 2009).

Modelo Matemático Proposto

Para a quantificação dos polifenóis totais dos extratos obtidos da casca de *C. palanostigma*, os resultados da análise de regressão múltipla com a indicação dos respectivos coeficientes das variáveis de entrada e suas combinações. O modelo estatístico genérico de 2ª ordem está apresentado conforme polinômio representado na Equação 7 abaixo:

$$PT = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_1 X_1^2 + \beta_2 X_2^2 + \beta_3 X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad 7$$

Ao processar os resultados e discriminar os coeficientes significativos, substituindo os valores dos respectivos coeficientes, obteve-se a seguinte equação 8 com as variáveis codificadas:

$$PT = 15,02 - 1,84750X_2 - 2,16X_3 - 2,85X_1^2 + 2,59X_3^2 + 4,48X_2X_3 \quad 8$$

A análise da equação obtida para o modelo permitiu observar que as variáveis X_2 (tempo de extração), X_3 (relação massa/solvente) e a quadrática X_1^2 , apresentaram um efeito negativo ao sistema indicando que essas variáveis não tem relação direta com o processo de quantificação dos polifenóis totais através do método de extração convencional.

As variáveis, quadrática X_3^2 e as combinadas X_2X_3 apresentaram efeitos positivos indicando que o rendimento tem relação direta entre essas condições combinadas.

Análise dos Efeitos Estimados

Os Efeitos Estimados demonstram os valores estimados estabelecidos pelo Statistic® em relação ao erro padrão mostrando desta forma quais as variáveis são significativas para a quantificação dos polifenóis totais demonstrados na Tabela 14.

Tabela 14: Efeitos Estimados para Quantificação dos Polifenóis Totais

FACTOR ¹	EFEITOS	ERRO PADRÃO
Média	15,24	0,24
X ₁	2,24	0,59
X₁²	2,85	0,43
X₂	-3,69	0,59
X ₂ ²	-0,56	0,43
X₃	-4,32	0,59
X₃²	-2,59	0,43
(X ₁ x X ₂)	-3,22	0,83
(X ₁ x X ₃)	-1,31	0,83
(X₂ x X₃)	8,96	0,83

Legenda: X₁=Temperatura; X₂=tempo; X₃=Relação massa/solvente

Os efeitos estimados das variáveis isoladas e de suas combinações binárias mostradas na Tabela 14 indicam que as variáveis lineares X₂(tempo) e X₃ (relação massa/solvente), as quadráticas X₁² e X₃², e a combinada (X₂xX₃), apresentam efeitos significativos para a resposta PT.

As variáveis X₁² e X₂xX₃ proporcionaram um efeito positivo na resposta, sendo estatisticamente significativa para obtenção do resultado (PT) enquanto que as variáveis X₂, X₃ e X₃² proporcionam um efeito negativo, sendo estatisticamente não significativa para obtenção do resultado (PT) da extração.

Então se pode dizer que se aumentando os níveis, do mais baixo (-1) ao mais alto (+1), das variáveis significativas promove-se um aumento, em média, de 2,84% e 8,96%, respectivamente para as variáveis X₁² e X₂xX₃ no processo de extração, o que é desejável para a resposta PT.

Análise de Variância

Para a determinação da significância estatística dos efeitos das variáveis de entrada na resposta quantificação de polifenóis totais das extrações convencionais, PT, com mais propriedade, é realizada uma análise de variância (ANOVA) conforme indicado na Tabela 15.

Tabela 15: ANOVA para Quantificação dos Polifenóis Totais

FATOR DE VARIAÇÃO	SQ	GL	MQ	F	p
X_1	10,0128	1	10,01281	14,4645	0,062703
X_1^2	29,9469	1	29,94694	43,2613	0,022344
X_2	27,3061	1	27,30605	39,4463	0,024426
X_2^2	1,2403	1	1,24031	1,7917	0,312585
X_3	37,3680	1	37,36801	53,9818	0,018025
X_3^2	24,7126	1	24,71262	35,6998	0,026887
(X_1 x X_2)	10,3684	1	10,36840	14,9782	0,060744
(X_1 x X_3)	1,7292	1	1,72923	2,4980	0,254774
(X_2 x X_3)	80,2816	1	80,28160	115,9748	0,008513
Falta de ajuste	31,3439	3	10,44796	15,0931	0,062777
Erro Puro	1,3845	2	0,69223		
Total SQ	260,3255	14			

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática; N° de Fisher; p: Análise de probabilidade; X_1 =Temperatura; X_2 =tempo; X_3 =Relação massa/solvente.

Pelo exame da ANOVA verifica-se que as variáveis de entrada X_2 (t) e X_3 (g/mL), as quadráticas X_1^2 (T^2) e X_3^2 [(g/mL)²], e a combinação (X_2 x X_3) (t x g/mL) são estatisticamente significativas em um nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$). As demais combinações não são estatisticamente significativas para a resposta PT, ou seja, estão dentro da região de hipótese nula.

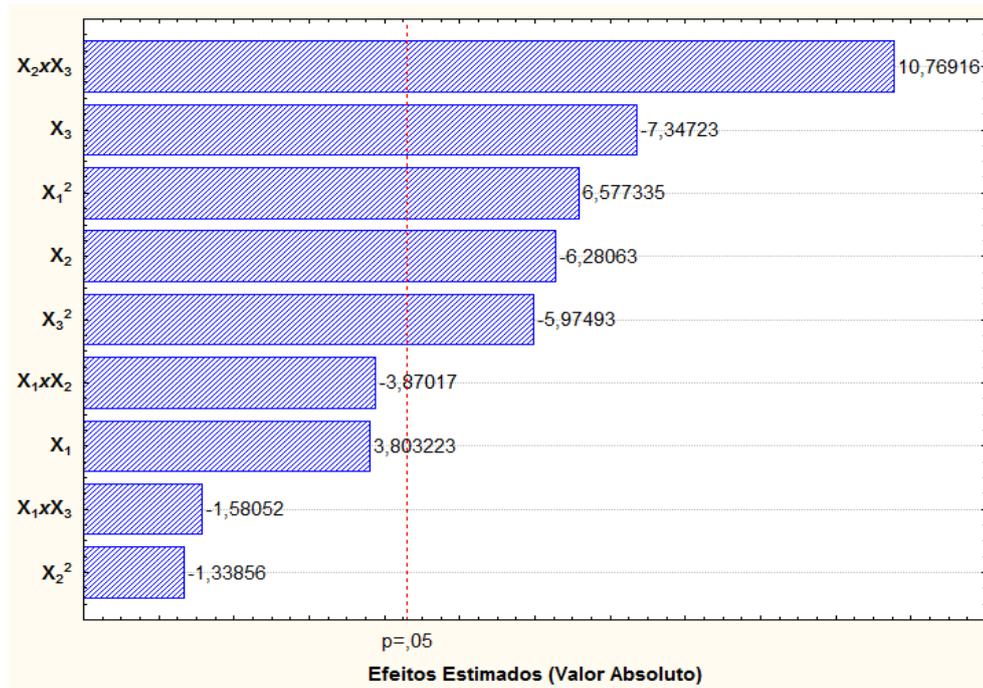
Avaliando o valor de F calculado ($F_{0,5,3,2}$) = 15,0931 é maior que o valor F crítico ($F_{0,5,3,2}$) = 19,164, conforme valor tabelado em Box, Hunter e Hunter (1978), indicando que não há falta de ajuste para o modelo proposto.

O valor de R^2 indica que 87,42% da variância é explicada pela regressão. Este resultado é considerado satisfatório satisfazendo assim o modelo matemático proposto.

Análise do Gráfico de Pareto

A Figura 21 mostra os efeitos individuais e combinados em relação à variável resposta, (PT) do processo de extração da casca do caule do *C. palanostigma*.

Figura 21: Gráfico de Pareto para a Quantificação dos Polifenóis Totais



Legenda: X_1 =Temperatura; X_2 =tempo; X_3 =Relação massa/solvente.

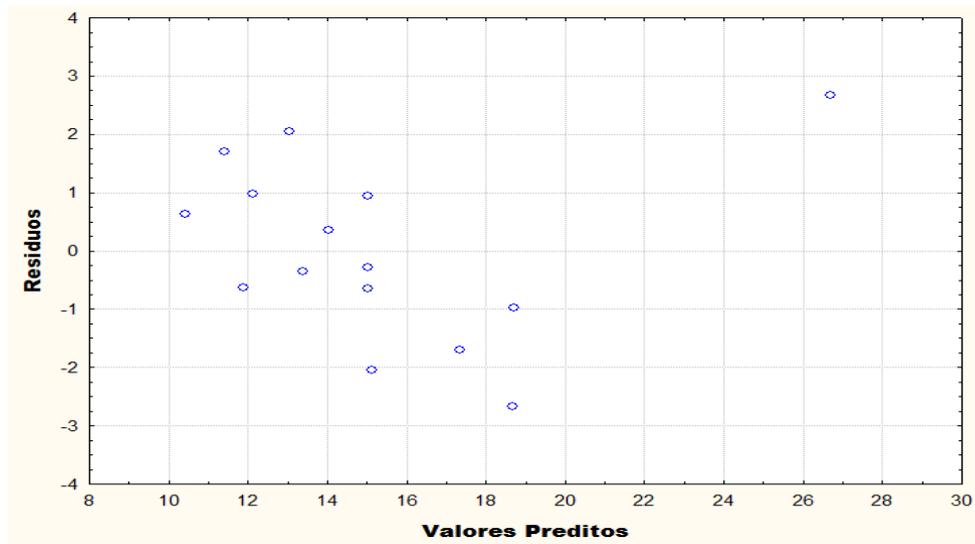
A Figura 21 nos mostra que as variáveis isoladas lineares e quadráticas X_2 , X_3 , X_1^2 e X_3^2 , e a combinada ($X_2 \times X_3$) são significativas, em nível de 95% do limite de confiança, pois essa variável está localizada à direita da reta vertical indicativa do limite de rejeição da hipótese nula ($p = 0,05$).

As variáveis X_2 e X_3 e a quadrática X_3^2 tem valor absoluto igual a - 6,28063, - 7,34723, - 5,97493 respectivamente e apesar de se apresentar como uma variável significativa também possui um efeito negativo, ou seja, dentro do processo ele produz uma redução na quantificação dos polifenóis totais do processo extrativo.

Análise dos Resíduos

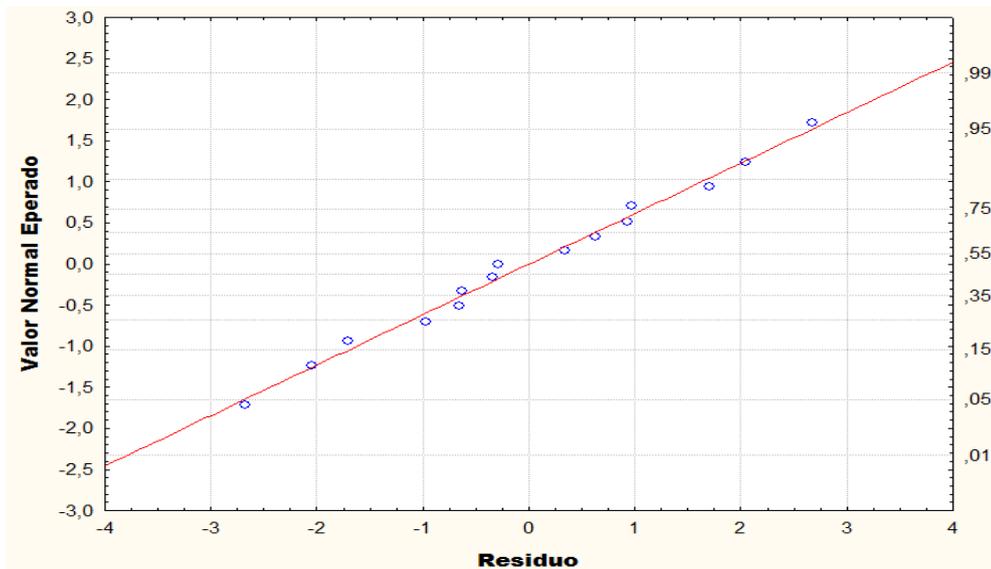
O modelo proposto foi avaliado através da análise dos resíduos como apresentado na Figura 22, que representa que a distribuição dos resíduos são todas aleatória, não apresentando desta forma, um comportamento tendencioso ou sistemático, o que indica a independência das variáveis de entrada, admitindo que o modelo matemático descreva bem os resultados experimentais, portanto, não havendo inconsistência entre estes e os valores calculados.

Figura 22: Gráfico da Distribuição dos resíduos em função dos valores preditos para o Polifenóis Totais



A Figura 23 mostra que os resíduos seguem uma distribuição de probabilidade normal, o que está de acordo com os pressupostos estatísticos, que devem ser obedecidos para que o modelo de regressão tenha qualidade na previsão dos valores da resposta.

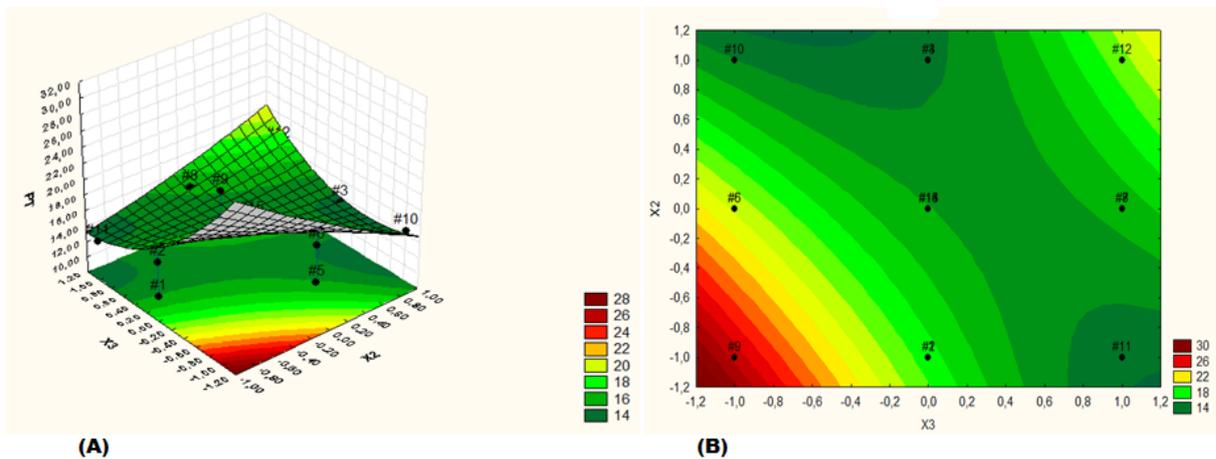
A Figura 23: Gráfico do Teste de Normalidade para o Polifenóis Totais



Análise da Superfície de Resposta

Para a construção da superfície de resposta e o contorno de nível ilustrado na Figura 23, será montando em função de $X_1(t)$ e $X_2(t)$, mantendo-se X_3 (g/mL) fixo no ponto 0 ($X_3 = 0$).

Figura 24: Gráfico da Superfície de resposta e curva de nível para a Quantificação dos Polifenóis Totais



Legenda: Superfície de Resposta (A) e Curva de Nível (B)

Avaliando-se as superfícies de respostas e os contornos indicados na Figura 24 percebe-se com clareza que as condições que propiciam o aumento da quantificação dos polifenóis totais, ou seja, favorecem o processo, correspondem ao menor valor das variáveis X_2 (tempo) e a variável X_3 (g/mL), sendo $t = 30$ min e $g/mL = 1:2$.

5.2.2.3. Avaliação da Atividade Antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante (AA) dos extratos obtidos na extração convencional podem ser observados na Tabela 16. Com relação ao método do DPPH, verificou-se uma grande variabilidade dos resultados para a capacidade antioxidante, oscilando entre 30,71% (ensaio 6) e 56,61% (ensaio 7). Este intervalo de resultados obtidos pode ser explicado, provavelmente, por diferenças de composição química entre os ensaios, especialmente com relação, por exemplo, de compostos fenólicos, bem como ao emprego das variáveis de entrada (Temperatura, tempo de extração e relação massa/solvente) no processo

de extração, o que resultaria em extratos com diferentes concentrações destes compostos e, consequentemente, com diferentes valores de capacidade antioxidante.

Tabela 16: Valores dos Resultados para a Atividade Antioxidante

ENSAIOS	VARIÁVEIS REAIS			AA
	T (°C)	t (min)	S-L (g/mL)	(IC ₅₀)
1	30	30	1:4	45,75
2	60	30	1:4	39,71
3	30	90	1:4	48,29
4	60	90	1:4	53,73
5	30	60	1:2	42,51
6	60	60	1:2	30,71
7	30	60	1:6	56,61
8	60	60	1:6	50,32
9	45	30	1:2	38,85
10	45	90	1:2	42,70
11	45	30	1:6	40,65
12	45	90	1:6	43,68
13	45	60	1:4	39,80
14	45	60	1:4	36,40
15	45	60	1:4	34,80

Legenda: T= temperatura; t= tempo; S-L =sólido-líquido; AA= Atividade Antioxidante; IC₅₀= Concentração mínima responsável por diminuir o DPPH em 50 %.

Neste trabalho os valores mínimos e máximos da atividade antioxidante obtidos foram nos ensaios 7 e 6 com 56,61% e 30,71% respectivamente enquanto que no trabalho realizado por Rodrigues em 2013, a avaliação da atividade antioxidante foi realizado utilizando a curva de calibração do Trolox e obteve os valores mínimos e máximos nos ensaios 10 (T= 40°C; t= 90 min; g/mL= 1:2) e 2 (T= 60°C; t= 30 min; g/mL= 1:4) com 7,42 e 10,33 mg de Equivalente Trolox por g de amostra respectivamente. A diferença dos resultados pode estar na utilização de solventes de polaridades diferente, utilização de equipamentos distintos entre outros.

Estudos realizados com compostos fenólicos quanto a sua capacidade de captura de radicais livres permitem caracterizar quais deles ocorrem naturalmente como antioxidantes. Os polifenóis, entre eles proantocianinas, possuem uma estrutura química ideal para combater radicais livres e tem se mostrado mais efetivos que os antioxidantes usuais. As propriedades químicas dos polifenóis como agentes redutores na forma de doar hidrogênio ou doar elétrons prediz seu potencial de ação como sequestrador de radicais livres (RICE-EVANS et al.,1995).

Modelo Matemático Proposto

Para a avaliação das atividades antioxidante dos extratos por extração convencional, os resultados da análise de regressão múltipla com a indicação dos respectivos coeficientes das variáveis de entrada e suas combinações realizadas pelo software Statistic®. O modelo estatístico genérico de 2ª ordem está apresentado conforme polinômio representado na Equação 9 abaixo:

$$AA = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_1X_1^2 + \beta_2X_2^2 + \beta_3X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 \quad 9$$

Ao processar os resultados e discriminar os coeficientes significativos, substituindo os valores dos respectivos coeficientes, obteve-se a seguinte equação 10 com as variáveis codificadas:

$$AA = 36,99 + 4,56X_3 + 6,72X_1^2 \quad 10$$

Análise dos Efeitos Estimados

Os Efeitos Estimados demonstram os valores estimados estabelecidos pelo Statistic® em relação ao erro padrão mostrando desta forma quais as variáveis são significativas para a avaliação da atividade antioxidante demonstrado na Tabela 17.

Tabela 17: Efeitos Estimados para Avaliação da Atividade Antioxidante

FACTOR ¹	EFEITOS	ERRO PADRÃO
Média	44,46	0,74
X ₁	- 4,67	1,80
X₁²	- 6,72	1,33
X ₂	5,86	1,80
X ₂ ²	- 3,15	1,33
X₃	9,12	1,80
X ₃ ²	- 1,32	1,33
(X ₁ x X ₂)	5,74	2,55
(X ₁ x X ₃)	2,75	2,55
(X ₂ x X ₃)	- 0,41	2,55

X₁=Temperatura; X₂=tempo; X₃=Relação massa/solvente.

Os efeitos estimados das variáveis isoladas e de suas combinações binárias mostradas na Tabela 17 indicam que a variável linear X₃ (g/mL) e a quadrática X₁², apresentaram efeitos significativos para a resposta AA.

A variável X₃ proporciona um efeito positivo na resposta, sendo estatisticamente significativa para obtenção do resultado (AA) enquanto que a variável X₁² proporciona um efeito negativo, sendo estatisticamente não significativa para obtenção do resultado (AA) da extração convencional.

Então se pode dizer que se aumentando os níveis, do mais baixo (-1) ao mais alto (+1), da variável significativa promove-se um aumento, em média, de 9,12% para a variável X₃ no processo de extração, o que é desejável para a resposta AA.

Análise de Variância

Para a determinação da significância estatística dos efeitos das variáveis de entrada na resposta avaliação da atividade antioxidante (AA) das extrações convencionais, com mais propriedade, é realizada uma análise de variância (ANOVA) conforme indicado na Tabela 18.

Tabela 18: ANOVA para Quantificação dos Polifenóis Totais

FATOR DE VARIAÇÃO	SQ	GL	MQ	F	p
X_1	43,67	1	43,67	6,70	0,12
X_1^2	166,66	1	166,66	25,58	0,04
X_2	68,73	1	68,73	10,55	0,08
X_2^2	36,66	1	36,66	5,63	0,14
X_3	166,46	1	166,46	25,55	0,04
X_3^2	6,44	1	6,44	0,99	0,42
(X_1 x X_2)	32,96	1	32,96	5,05	0,15
(X_1 x X_3)	7,56	1	7,56	1,16	0,39
(X_2 x X_3)	0,18	1	0,18	0,02	0,89
Falta de ajuste	169,54	3	56,51	8,67	0,10
Erro Puro	13,03	2			
Total SQ	695,97	14			

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática; N^o de Fisher; p: Análise de probabilidade; X_1 =Temperatura; X_2 =tempo; X_3 =Relação massa/solvente.

Pelo exame da ANOVA verifica-se que a variável de entrada X_3 (g/mL) e a quadrática X_1^2 (T^2) são estatisticamente significativas em um nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$) e as demais combinações não são significativas para a resposta AA, ou seja, estão dentro da região de hipótese nula.

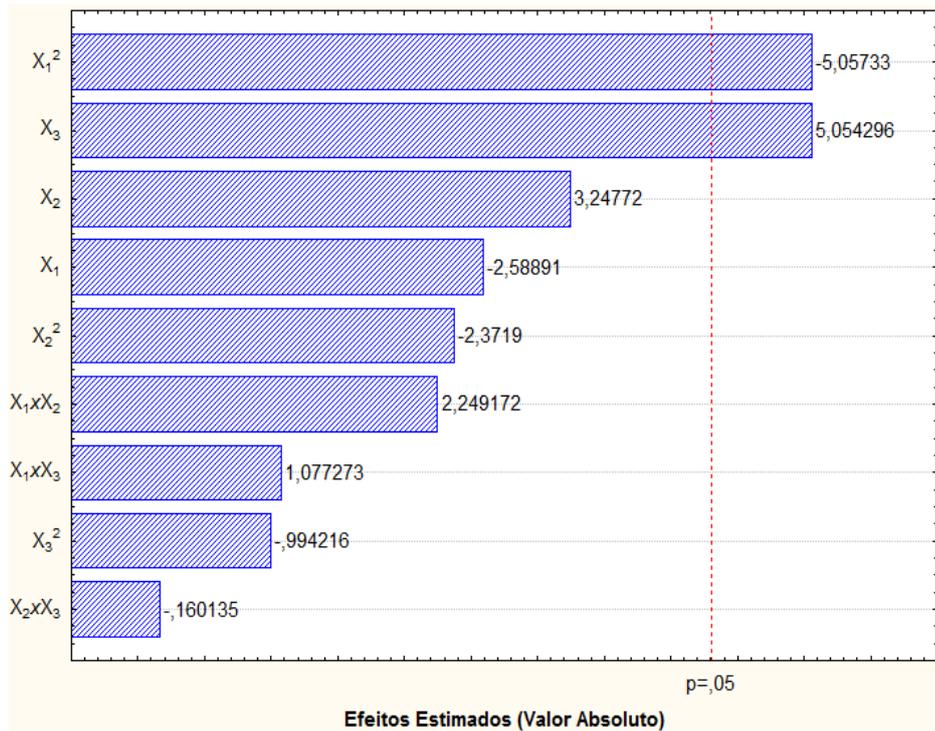
Avaliando o valor de F calculado ($F_{0,5; 3,2}$) = 8,67 é menor que o valor F crítico ($F_{0,5; 3,2}$) = 19,164, conforme valor tabelado em Box, Hunter e Hunter (1978), indicando que há falta de ajuste para o modelo proposto.

O valor de R^2 indica que 73,77% da variância é explicada pela regressão. Este resultado é considerado moderadamente satisfatório satisfazendo assim o modelo matemático proposto.

Análise do Gráfico de Pareto

A Figura 25 mostra os efeitos individuais e combinados em relação à variável resposta, (AA) do processo de extração da casca do caule do *C. palanostigma*.

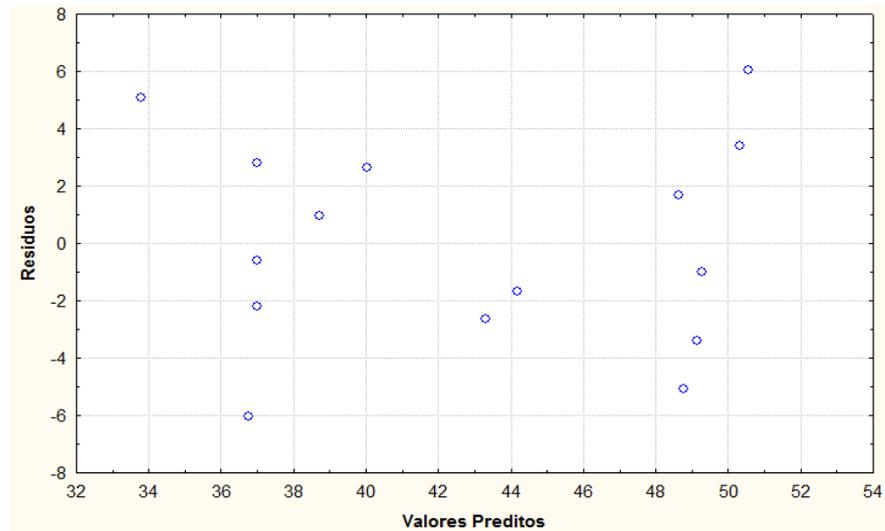
Figura 25: Gráfico de Pareto para Atividade Antioxidante



Análise dos Resíduos para Atividade Antioxidante

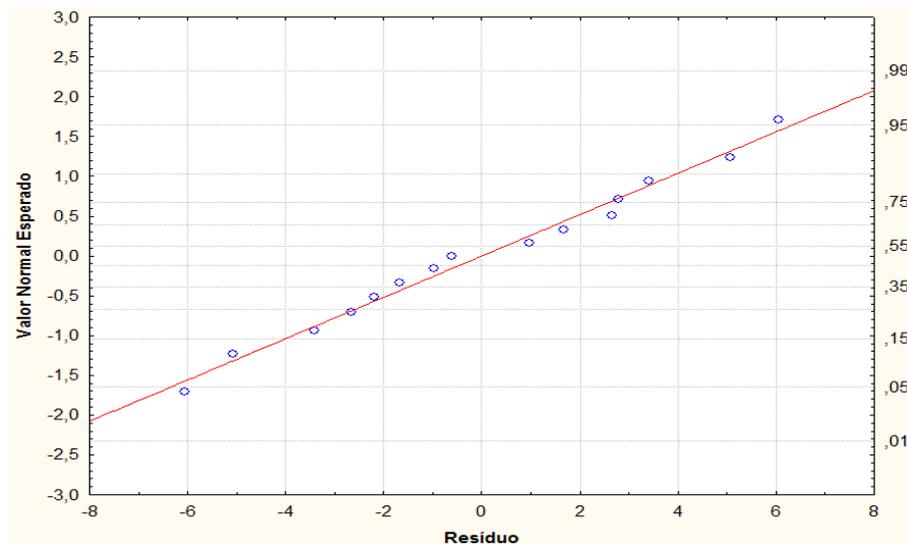
O modelo proposto foi avaliado através da análise dos resíduos como apresentado na Figura 26 que representa a distribuição dos resíduos em função dos valores preditos pelo modelo proposto e que avalia sua amplitude e distribuição em torno do zero, determinando que a distribuição dos resíduos deva ser totalitariamente aleatória, não apresentando desta forma, comportamento tendencioso ou sistemático, o que indica a independência das variáveis de entrada, podemos admitir o que o modelo matemático descreve relativamente bem a equação proposta, já que experimento envolve produtos naturais, os quais envolvem parâmetros de difícil controle e avaliação.

Figura 26: Gráfico da Distribuição dos resíduos para a Atividade Antioxidante



A Figura 27 mostra que os resíduos seguem uma distribuição de probabilidade normal, o que está de acordo com os pressupostos estatísticos, que devem ser obedecidos para que o modelo de regressão tenha qualidade na previsão dos valores da resposta.

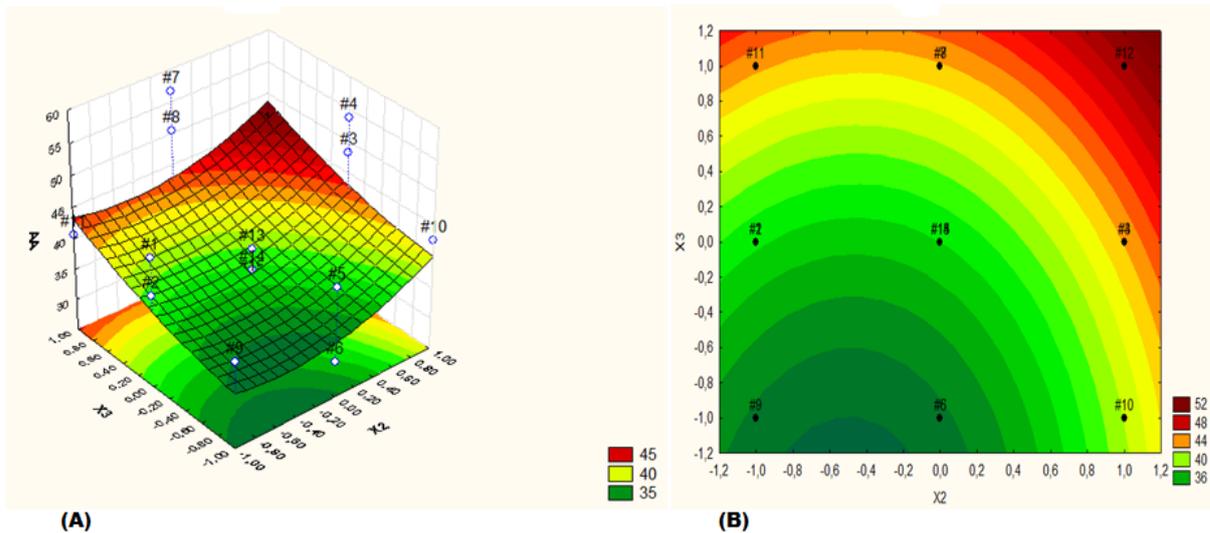
Figura 27: Gráfico do Teste de Normalidade para a Atividade Antioxidante



Análise da Superfície de Resposta

Para a construção da superfície de resposta ilustrado e o contorno de nível ilustrado na Figura 28, será montando em função de $X_1(t)$ e $X_2(t)$, mantendo-se X_3 (g/mL) fixo no ponto 0 ($X_3 = 0$).

Figura 28: Gráfico da Superfície de resposta e curva de nível para Atividade Antioxidante



Legenda: Superfície de Resposta (A) e Curva de Nível (B); AA= Atividade Antioxidante; X_2 = tempo; X_3 = g/mL

Avaliando-se as superfícies de respostas e os contornos indicados na Figura 28 percebe-se que as condições que propiciam o aumento da atividade antioxidante, ou seja favorecem o processo, correspondem aos valores mínimos e médios variável $X_2(t)$ (+1, 0), ou seja $t = 30$ e 60 min e os valores mínimo e médio da variável $X_3(\text{g/mL})$ (-1, 0), ou seja g/mL = 1:2 e 1:4.

5.2.2.4. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Os extratos obtidos pela extração convencional da casca do *C. palanostigma* foram submetidos ao teste do CIM, que é a determinação da menor quantidade da amostra necessária para inibir o crescimento do micro-organismo. Portanto, foi observado que para os extratos obtidos em todos os ensaios apresentaram atividade antimicrobiana nem que seja pelo menos em uma das suas concentrações frente a todas as bactérias utilizadas neste estudo. Os ensaios 1, 2, 3, 6, 7, 8 foram efetivos na inibição quando testadas com todas as cepas bacterianas e fúngica. No estudo de Fontenelle et al. (2008) observaram que a CIM do óleo

essencial de *C. zehntneri*, extraído de folhas, para inibir o crescimento das cepas *C. tropicalis* foi $2.500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para *C.albicans* foi $\geq 5.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ enquanto que para o extrato do *C. palanostigma* observou-se uma inibição com CIM de $31,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Já para o *S. typhi* destacou-se os ensaios 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 9. Para o *S. aureus* as ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 12. Para análise do fungo com exceção das ensaios 5 e 9 todas tiveram atividades antimicrobianas em alguma das concentrações utilizada.

Em estudo realizado por Rodrigues em 2013, já pode ser observado a atividade antimicrobiana dos extratos do *C. palanostigma* frente cepa *E. coli*, *S. typhi* e *S. aureus* pelo método de difusão em disco.

Os resultados se mostraram satisfatórios, pois bactérias da família *Enterobacter* como, por exemplo, a *E. coli* e *Enterobacter spp*, são extremamente difíceis de serem tratadas fato este que pode ser explicado devido a morfologia da bactérias gram-negativa uma vez que estas possuem uma membrana externa, que consiste em uma dupla camada de lipídios, contendo moléculas de proteínas e lipoproteínas ligadas ao peptidoglicano. Além disso agregado a membrana externa, há o espaço periplasmático, composto por enzimas responsáveis pela inativação de algumas substâncias com ação antibacteriana. Isso explica por que muitos agentes antimicrobianos tem dificuldade de penetrar nessa membrana. (TRABULSI et al.,2005).

Através da Tabela 19 pode-se observar que as variáveis, tempo de extração e relação massa/solvente pode ter tido grande influência para que houvesse atividade inibitória frente às cepas utilizadas, como podemos perceber nos ensaios 1, 2 e 3 que tiveram atividade e possuíam o mesmo tempo de extração e a mesma relação massa/solvente (g/mL), assim também como as ensaios 5 e 6, 7 e 8. Também podemos observar que no ensaio 6 onde foi obtido a maior atividade antioxidante foi a que demonstrou a menor concentração mínima inibitória para todas as cepas bacterianas além de também ser inibidor da cepa fúngica.

A Gentamicina foi o fármaco padrão utilizado como controle positivo, uma vez que o mesmo já se encontra no mercado e apresenta um ótimo resultado diante de vários patógenos que acometem o homem há várias décadas.

Tabela 19: Valores dos resultados da Concentração Inibitória Mínima

ENSAIOS	VARIÁVEIS REAIS			CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA; ATIVIDADE ANTIMICROBIANA BACTERIOSTÁTICA. (µg/mL)				
	T (°C)	t (min)	S-L (g/mL)	<i>E. coli</i>	<i>Entero</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
1	30	30	1:4	31,5; A	500; M	31,5; A	31,5; A	31,5; A
2	60	30	1:4	31,5; A	500; M	31,5; A	31,5; A	31,5; A
3	30	90	1:4	500; M	500; M	31,5; A	31,5; A	31,5; A
4	60	90	1:4	> 1000; SA	> 1000; SA	> 1000; SA	31,5; A	250; M
5	30	60	1:2	31,5; A	31,5; A	31,5; A	31,5; A	> 1000; SA
6	60	60	1:2	31,5; A	31,5; A	31,5; A	31,5; A	62,50; A
7	30	60	1:6	31,5; A	250; M	500; M	500; M	125; M
8	60	60	1:6	500; M	250; M	500; M	500; M	500; M
9	45	30	1:2	31,5; A	250; M	500; M	31,5; A	> 1000; SA
10	45	90	1:2	>1000; SA	500; M	> 1000; SA	> 1000; SA	500; M
11	45	30	1:6	31,5; A	> 1000; SA	> 1000; SA	> 1000; SA	125; M
12	45	90	1:6	31,5; A	> 1000; SA	> 1000; SA	31,5; A	125; M
13	45	60	1:4	> 1000; SA	> 1000; SA	> 1000; SA	> 1000; SA	500; M
14	45	60	1:4	> 1000; SA	> 1000; SA	> 1000; SA	> 1000; SA	500; M
15	45	60	1:4	> 1000; SA	> 1000; SA	> 1000; SA	> 1000; SA	500; M

Legenda: T= temperatura; t= tempo; S-L =sólido-líquido;

5.2.3. Análise da Função Desejabilidade

Para a análise de desejabilidade global por meio do software Statistica® 7.0, utiliza-se uma grade de 30 pontos para cada uma das 3 variáveis independentes, ou seja, dessa forma os valores das respostas e respectivas desejabilidades são calculadas em 30³ combinações de níveis para os fatores.

Na Tabela 20 observa-se as condições atribuídas na otimização, em que as variáveis de entradas proporcionaram os melhores resultados, ou seja, maior rendimento na extração convencional, com a maior quantificação de polifenóis totais e atividade antioxidante.

Tabela 20: Valores atribuídos na função desejabilidade global

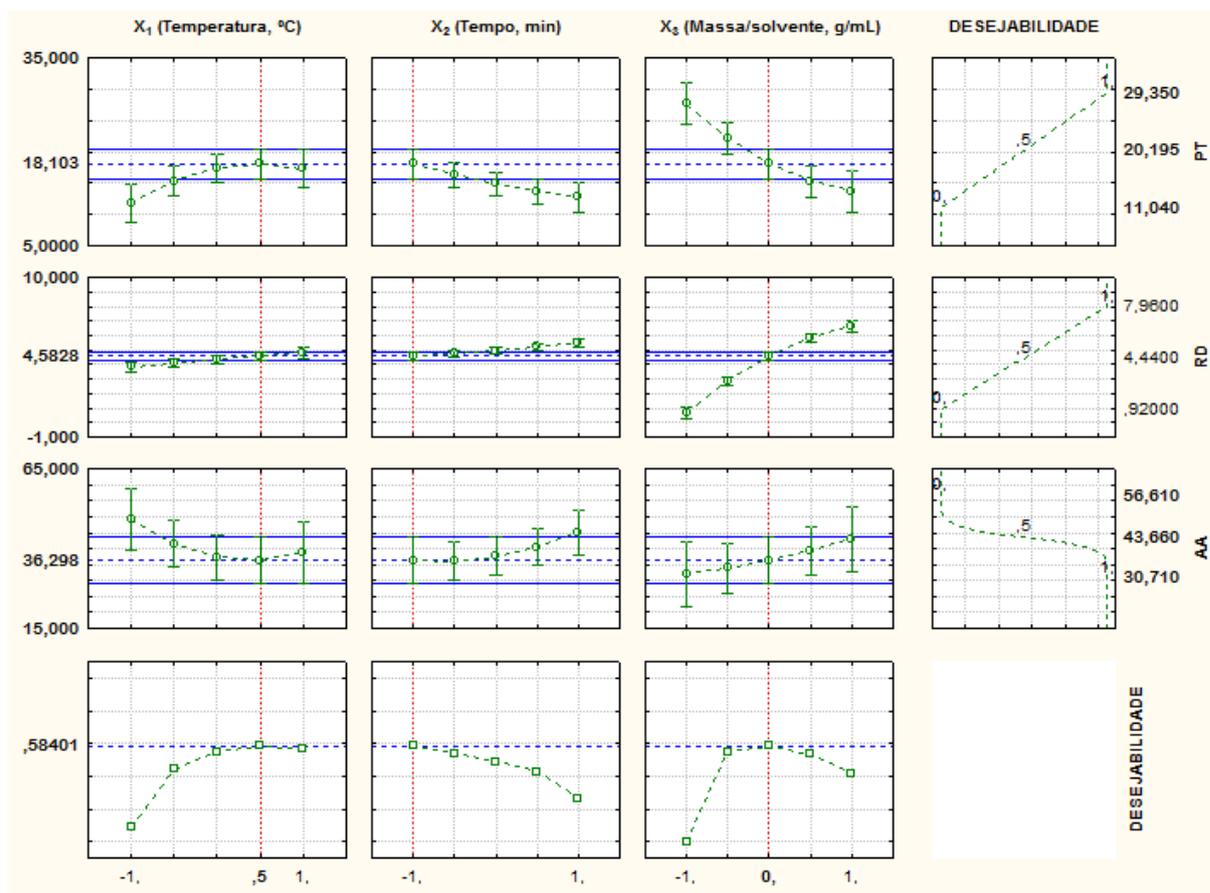
Condições para as respostas	Valor atribuído na otimização		
	Rd (%)	PT (mg EGA/g)	AA (%IC ₅₀)
Baixo	0,92	11,40	56,61
Médio	4,44	20,19	43,66
Alto	7,96	29,35	30,71

Legenda: Rd= Rendimento; PT= Polifenóis Totais; mg= miligrama; EAG= Equivalente Àcido Gálico; AA= Atividade Antioxidante; %IC₅₀: Inibição da concentração em 50%.

A Figura 29 demonstra a função desejabilidade global obtida, usando $s = t = 5$ e fator de grade igual a 30. Verifica-se que a função cumpre satisfatoriamente as características estabelecidas, pois apresenta um coeficiente de desejabilidade global (D) igual a 0,584 considerado aceitável porém pobre, isso indica de acordo com Akhnazarova & Kafarov (1982), que a qualidade é aceitável para os limites de especificação, mas a melhoria é desejável.

Assim, a função desejabilidade pode especificar os níveis de cada uma das variáveis de entrada [X_1 - Temperatura (°C); X_2 -tempo (min); X_3 -relação massa/solvente (g/mL)], que permitem a maximização das variáveis de resposta Rendimento (Rd,%), quantificação dos polifenóis totais (EGA/g) e da atividade antioxidante (%EC₅₀) dos extratos obtidos na extração convencional.

Figura 29: Gráfico da Função desejabilidade global para extração convencional



Legenda: PT= Polifenóis Totais; RD= Rendimento; AA= Atividade Antioxidante

Para determinar o ponto ótimo do planejamento experimental, as respostas obtidas são avaliadas por meio da função desejabilidade, e tem por principal objetivo analisar, simultaneamente, um planejamento experimental com múltiplas variáveis de respostas, determinando em um único ponto do planejamento as condições de obtenção da resposta mais próxima do desejável para cada variável.

Na Figura 29 estão apresentadas as condições ótimas na forma codificada que representam os seguintes valores: X_1 (Temperatura) igual a 0,5, X_2 (tempo) igual a -1 e X_3 igual a 0. As variáveis de entrada com esses níveis codificados propiciam obter-se as respostas rendimento de extrato obtido de 4,58%, quantificação de polifenóis de 18,10 EAG/g e atividade antioxidante 36,29% EC_{50} . Conhecendo-se os correspondentes valores reais da temperatura, tempo e relação massa/solvente pode-se concluir sobre o ponto ótimo das variáveis de entrada em termos de temperatura, a duração do processo de extração

convencional em minutos (tempo) e de massa de matéria prima em gramas com a quantidade de solvente utilizado, valores tais que permitem obter respostas otimizadas simultaneamente.

TABELA 21: Respostas rendimento, PT, Atividade antioxidante e antimicrobiana para a extração convencional

ENSAIOS	VARIÁVEIS REAIS (UND)			VARIÁVEIS RESPOSTA (UND)							
	T	t	S-L	RD	PT	AA	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA; ATIVIDADE ANTIMICROBIANA BACTERIOSTÁTICA. (µg/mL)				
	(°C)	(min)	(g/mL)				(%)	(mg EAG/g)	IC ₅₀ (%)	<i>E. coli</i>	<i>Entero</i>
1	30	30	1:4	4,28	11,25	45,75	31,5; A	500; M	31,5; A	31,5; A	31,5; A
2	60	30	1:4	4,91	15,63	39,71	31,5; A	500; M	31,5; A	31,5; A	31,5; A
3	30	90	1:4	4,58	13,10	48,29	500; M	500; M	31,5; A	31,5; A	31,5; A
4	60	90	1:4	5,33	11,04	53,73	> 1000; SA	> 1000; SA	> 1000; SA	31,5; A	250; M
5	30	60	1:2	2,45	13,10	42,51	31,5; A	31,5; A	31,5; A	31,5; A	> 1000; SA
6	60	60	1:2	0,92	17,73	30,71	31,5; A	31,5; A	31,5; A	31,5; A	62,50; A
7	30	60	1:6	3,77	13,11	56,61	31,5; A	250; M	500; M	500; M	125; M
8	60	60	1:6	7,96	15,11	50,32	500; M	250; M	500; M	500; M	500; M
9	45	30	1:2	1,17	29,35	38,85	31,5; A	250; M	500; M	31,5; A	> 1000; SA
10	45	90	1:2	3,56	14,37	42,70	>1000; SA	500; M	> 1000; SA	> 1000; SA	500; M
11	45	30	1:6	5,17	13,05	40,65	31,5; A	> 1000; SA	> 1000; SA	> 1000; SA	125; M
12	45	90	1:6	5,65	15,99	43,68	31,5; A	> 1000; SA	> 1000; SA	31,5; A	125; M
13	45	60	1:4	4,75	14,37	39,80	> 1000; SA	> 1000; SA	> 1000; SA	> 1000; SA	500; M
14	45	60	1:4	4,60	14,74	36,40	> 1000; SA	> 1000; SA	> 1000; SA	> 1000; SA	500; M
15	45	60	1:4	4,79	15,96	34,80	> 1000; SA	> 1000; SA	> 1000; SA	> 1000; SA	500; M

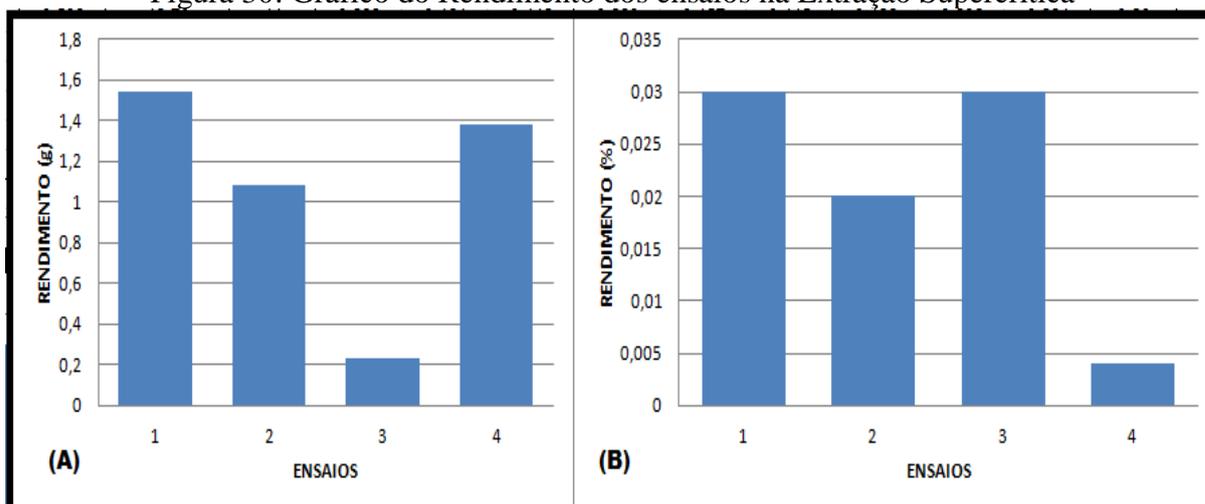
T: Temperatura; t: tempo; S-L: Sólido-líquido; °C: graus Celsius; g/mL: grama/mililitro; Rd: rendimento da extração; PT: Polifenol Total; AA: Atividade Antioxidante; %: Porcentagem; mg EAG/g: miligrama de Equivalentegrama de Ácido Gálico por grama de amostra; IC₅₀: Índice de Concentração de redução a 50% do DPPH; A: Atividade Antimicrobiana Bacteriostática Ativa; M: Atividade Antimicrobiana Bacteriostática Moderada; SA: Sem atividade.

5.2.4. Extração com Fluido Supercrítico

5.2.4.1. Análise do Rendimento

Os ensaios foram realizados de acordo com a matriz de planejamento, descritos na Tabela 17, onde são apresentadas as variáveis de entrada (temperatura e pressão) e as respostas rendimento – Rendimento (Rd), Quantificação de polifenóis totais (PT), Atividade Antioxidante (AA) e Atividade Antimicrobiana (CIM), correspondentes a cada ensaio.

Figura 30: Gráfico do Rendimento dos ensaios na Extração Supercrítica



Legenda: Extração Supercrítica A (T=40°C) e B (T=60°)

A extração supercrítica apresentou um maior rendimento para a ensaio de numero 1, que utilizou a pressão a 100 bar com a temperatura de 40 °C, seguidas das ensaios 4, 2 e 3, com 400, 200 e 300 bar respectivamente. Já para a temperatura de 60°C os ensaios 1 e 3 tiveram o mesmo rendimento, seguidos do ensaio 2 e posteriormente o 4 como mostra o gráfico 16.

Segundo Carvalho-Junior et al. (2003), há dois principais efeitos da temperatura sobre a solubilidade e rendimento, a massa específica do solvente e a pressão de vapor do soluto. A pressão de vapor do soluto aumenta com o aumento da temperatura. No entanto, neste experimento, a massa específica do solvente teve efeito dominante no processo de extração. Este comportamento está de acordo com Geankoplis (1993), que diz que altas massas específicas do fluido aumentam o poder do solvente, o que geralmente é conseguido com a diminuição da temperatura do processo de extração.

Estes resultados concordam com Benelli et al. (2010), que encontrou resultados semelhantes utilizando CO₂ supercrítico para extração de antioxidantes e compostos bioativos do bagaço de laranja. Na condição de 100 bar, o rendimento diminuiu de 1,16 (m/m) para 0,84 (m/m) com a elevação da temperatura de 40 °C para 50 °C, devido a redução na massa específica do CO₂ supercrítico.

Já Andrade (2011) também relatou uma diminuição do rendimento obtido por extração supercrítica da casca de café, na condição de 100 bar, com o aumento da temperatura de 40 °C para 60 °C, de $1,24 \pm 0,02\%$ para $0,55 \pm 0,02\%$.

Estudos realizados por Melecchi (2005) demonstrou que esse comportamento de oscilação do rendimento ocorre quando são utilizadas condições drásticas de Pressão e Temperatura utilizando apenas o CO₂ puro, comportamento este que vai se minimizando quando se utiliza co-solventes com polaridades diferentes.

5.2.4.2. *Quantificação dos Polifenóis Totais*

A quantificação de compostos fenólicos totais encontrados nos extratos etanólicos obtidos pela extração supercrítica dos caules de *C. palanostigma* encontram-se na Tabela 16, os quais foram calculados através da equação de regressão $y = 13x$, ($R^2 = 1$), obtida pela curva de calibração do ácido gálico (y é a absorbância a 750 nm e x é a concentração em mg de ácido gálico em g de extrato).

Os extratos obtidos pela extração supercrítica tiveram como valores mínimos e máximos os ensaios 2 e 1 com absorbância de 25,66 e 56,80 de mg EAG/g de extrato para temperatura 40°C e os ensaios 4 e 3 com absorbância de 7,072 e 34,94 o de mg EAG/g de extrato de polifenóis totais respectivamente.

5.2.4.3. *Análise da Atividade Antioxidante*

Segundo Jesus (2010), o valor de EC₅₀ representa a concentração efetiva para que se atinja 50 % de atividade antioxidante. Portanto, quanto menor o valor de EC₅₀, menor a concentração necessária para que se tenha 50 % de atividade antioxidante (AA) de acordo com o método do DPPH, e maior a atividade antioxidante do sistema em estudo. Em outras palavras, baixos valores para EC₅₀ estão associados à elevada AA e vice-versa.

Os resultados da atividade antioxidante (AA) dos extratos obtidos na extração supercrítica podem ser observados na Tabela 16. Com relação ao método do DPPH, verificou-se um intervalo relativamente pequeno na variabilidade dos resultados para a capacidade antioxidante, oscilando entre 52,60% (ensaio 1) e 64,88% (ensaio 4) para a extração a temperatura de 40°C e 52,36% (ensaio 3) e 62,69% (ensaio 1). Este intervalo de resultados obtidos pode ser explicado, provavelmente, por diferenças de composição química entre os ensaios, especialmente com relação aos compostos fenólicos presentes nos extratos, bem como ao emprego das variáveis críticas de entrada (Tc e Pc) no processo de extração, o que resultaria em extratos com diferentes concentrações destes compostos e, conseqüentemente, com diferentes valores de capacidade antioxidante.

5.2.4.4. *Análise da Atividade Antimicrobiana*

Para as análises realizadas com os extratos obtidos na extração SFE, observou-se que para as amostras obtidas com a T = 40° C tanto a *E. coli* quanto a *S. typhi* apresentaram inibição para a maior concentração de amostra do ensaio 1, os ensaios 1 e 3 apresentaram eficiência para a *S. aureus* e os ensaios 3 e 4 para o fungo *C. albicans*.

Para os ensaios obtidos a T = 60 °C as amostras não tiveram ação inibitória frente a *Enterobacter spp* e *E. coli*, para *S. typhi* e *S. aureus* os ensaios 3 e 4 apresentaram ação inibitória e os ensaios 1, 2 e 3 tiveram ação para o fungo *C. albicans*.

Vários fatores podem ser influenciadores nos testes de atividade antimicrobiana, como por exemplo, a forma de como ocorre à preparação do extrato, tipo de solvente empregado para a obtenção do extrato dentre outros. (COS et al., 2006).

Um aspecto bastante interessante na determinação da CIM de extratos é a preocupação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações. (PINTO et al., 2003)

Tabela 22: Resposta rendimento, Quantificação de Polifenóis Totais, Atividade Antioxidante e Antimicrobiana para a Extração Supercrítica

ENSAIOS	VARIÁVEIS ENTRADA		VARIÁVEIS RESPOSTA							
	PRESSAO (bar)	TEMPERATUA (°C)	RD (%)	PT (mg EAG/g)	AA IC ₅₀ (%)	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA; ATIVIDADE ANTIMICROBIANA BACTERIOSTÁTICA. (µg/mL)				
						<i>E. coli</i>	<i>Entero</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
1	100	40	1,54	56,80	52,66	500; M	> 1000 SA	500; M	250; A	> 1000 SA
2	200	40	1,08	25,66	62,08	> 1000 SA	> 1000 SA	> 1000 SA	500; M	> 1000 SA
3	300	40	0,23	32,72	60,18	> 1000 SA	> 1000 SA	> 1000 SA	500; M	500; M
4	400	40	1,38	28,64	64,88	> 1000 SA	> 1000 SA	> 1000 SA	> 1000 SA	> 1000 SA

ENSAIOS	VARIÁVEIS ENTRADA		EVARIÁVEIS RESPOSTAS							
	PRESSAO (bar)	TEMPERATUA (°C)	RD (%)	PT (mg EAG/g)	AA IC ₅₀ (%)	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA; ATIVIDADE ANTIMICROBIANA BACTERIOSTÁTICA. (µg/mL)				
						<i>E. coli</i>	<i>Entero</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
1	100	60	0,03	27,96	62,69	> 1000 AS	> 1000 SA	> 1000 SA	1000; I	250; M
2	200	60	0,02	26,68	59,18	> 1000 AS	> 1000 SA	> 1000 SA	> 1000 SA	250; M
3	300	60	0,03	34,94	52,36	> 1000 AS	> 1000 SA	125; M	125; M	250; M
4	400	60	0,004	7,072	60,09	> 1000 SA	> 1000 SA	125; M	125; M	250; M

T: Temperatura; t: tempo; S-L: Sólido-líquido; °C: graus Celsius; g/mL: grama/mililitro; Rd: rendimento da extração; PT: Polifenol Total; AA: Atividade Antioxidante; %: Porcentagem; mg EAG/g: miligrama de Equivalente grama de Ácido Gálico por grama de amostra; IC₅₀: Índice de Concentração de redução a 50% do DPPH; A: Atividade Antimicrobiana Bacteriostática Ativa; M: Atividade Antimicrobiana Bacteriostática Moderada; SA: Sem atividade.

6. CONCLUSÃO

6.1. Conclusão Geral

De forma geral podemos considerar que os métodos de extração desenvolvidos no estudo do *C. palanostigma* mostraram-se eficientes para os estudos, do rendimento, da quantificação dos polifenóis totais, da atividade antioxidante e da atividade antimicrobiológica.

A eficácia do método experimental aplicado neste trabalho pode ser atestada na análise estatística realizada, a qual foi possível observar que as variáveis individuais e combinadas do processo de extração foram influentes.

6.2. Conclusões Específicas

O planejamento estatístico foi uma ferramenta extremamente útil para o desenvolvimento do trabalho sendo que as três variáveis, temperatura, tempo de extração e a relação massa/solvente individual ou algumas combinações delas foram significativas para o processo. A relação massa/solvente foi a que apresentou o melhor resultado para o rendimento, seguidas da temperatura e depois do tempo. O modelo estatístico pode descrever relativamente bem à precisão do processo de aquisição do Rendimento na prática da extração. A falta de ajuste encontrado no modelo deve ser estudada e corrigida para haja possibilidade de um aumento na atividade antioxidante avaliados nos extratos obtidos.

As variáveis temperatura e pressão exercem efeito pronunciado sobre rendimento e a composição química dos extratos obtidos pela extração supercrítica

Para a quantificação dos polifenóis totais o comportamento foi bem análogo as variáveis, tempo e relação massa/solvente foram significativos para a extração convencional. O modelo estatístico descrever com ótima precisão o processo de quantificação dos polifenóis totais utilizando o planejamento experimental de Box-Behnken para a extração com reator encamisado de vidro.

Para a atividade antioxidante a extração convencional apresentaram os maiores valores a partir de IC₅₀ se comparado aos extratos obtidos pela extração supercrítica.

A espécie vegetal *Croton palanostigma* se apresenta como uma importante fonte de compostos que possuem atividades biológicas, visto que os extratos obtidos pela extração

convencional apresentaram maior inibição se comparadas com os extratos obtidos na frente às cepas microbiológicas estudadas neste trabalho.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Investigar quais os compostos que são responsáveis pela atividade antimicrobiana presente nos extratos obtidos da casca do *C. palanostigma*;
- Quantificar os diterpenos Aparistimano e Cordatina presentes nos extratos;
- Isolar os compostos biologicamente ativos;

8. BIBLIOGRAFIA

ANDRADE, K. S. Avaliação das técnicas de extração e do potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir de casca e de borra de café (*Coffea arábica* L.). Florianópolis: UFSC, 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

AKHNAZAROVA, S. KAFAROV, V. Experiment optimization In chemistry and chemical engineering. Moscow, 1982.

AHMED, F. E., Analysis of polychlorinated biphenyls in food products. Trend in Analytical Chemistry, v. 22, n.3, p.170-185. 2003.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; FLORENTINO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. Journal of Ethnopharmacology, v. 114, p. 25-354, 2007.

ALMAJANO, M.P.; CARBÓ, R.; JIMÉNEZ, A.L.; GORDON, M. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. Food Chemistry, v. 108, p. 55-63, 2008.

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

ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução N° 899. Brasília: 2003; 1-12.

ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L. A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. Química Nova, v. 31, p. 1224-1229, 2008.

APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society 161: 105-121.

AYALA, S.; JURUPE, H.; DÍAZ, D.; LOCK, O.; VEGA, M.; LUQUE, J.; GARNIQUE, M. Efecto protector de látex desecado y fracción alcaloidea de *Croton palanostigma* frente a injuria de mucosa gástrica inducida por etanol en ratas. Anales de la Facultad de Medicina, vol. 62, n. 4, p. 317-324, 2001.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry, v. 99, p. 191-203, 2006.

BARRETO, M. B.; GOMES, C. L.; FREITAS, J. V. B. DE; PINTO, F. DAS C. L.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; TORRES, D. S. C. Flavonoides e terpenoides de *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). *Química Nova*, v.xy, n. 00, 200_ . Publicado na web 2013.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; Planejamento e Otimização de Experimentos. Editora da Unicamp, 2001. 299pg.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; Como fazer experimentos. 3 ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2007.

BENELLI, P.; RIEHL, C. A. S.; JÚNIOR, A. S.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Bioactive extracts of Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. *J. of Supercritical Fluids*. v. 22, 2010. pag. 132 – 141.

BERRY, P. *Croton* Research Network. Madison, University of Wisconsin Board of Regents. 2006. Disponível em: <http://www.botany.wisc.edu/berry/projects/crotonFB/world.html>. Acesso em 29 de janeiro de 2016.

BITTNER, M. et al. Estudio quimico de especies de la familia Euphorbiaceae em Chile. *Bol. Soc. Chil. Quim.*, Concepción, v.46, n.4, p.1-15, Dec 2001.

BLASCO, AJ, GONZALEZ, MC, ESCARPA, A , Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. *Analytica Chimica Acta*. 511, 71-81. 2004.

BLOCK, S.; GERKENS, P.; PEULEN, O.; JOLOIS, O.; MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; DE PAUW-GILLET, M. C.; QUETIN-LECLERQ, J.. Induction of Apoptosis in human promyelocytic leukemia cells by a natural trachylobane diterpene. *Anticancer Research*, v. 25, p.363-368, 2004.

BORROR, C. M.; MONTGOMERY, D. C. Evaluation of Statistical Design for Experiments Involving Nois Variables Variables. *Journal of Quality Technology*, v. 34, n. 1, 2000.

BOUCHET,N; BARRIE, R,L; FAUCONNEAU, B, Radical scavenging activity and antioxidant proprieties of tannins from *Guiera senegalensis*,(Combretacea) *Phytotherapy research*, v. 12, 1998, p. 159.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Thchnometric*, v.2, p. 455-475, 1960.

BRANDÃO. M. G. L; Dossê Técnico, Produção de chás e extratos de plantas medicinais. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, pg. 17. 2007

BRASIL, D. S. B. Contribuição à química do gênero *Aparisthmium*. 1999. 232 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Belém, 1999.

BRASIL, D. S. B.; Estudo dos Constituintes Químicos de *Croton palanostigma* Klotzsch Utilizando Ferramentas Experimentais e de Modelagem Molecular: Identificação de Diterpenos com Potencial Atividade Antiulcerogênica e de Proteção Gástrica. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Belém, 2008. 23f.

BRASIL, D. S. B.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; ALVES, C. N.; ANDRADE, E. A. A.; DA SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S. Essential Oil Composition of *Croton palanostigma* Klotzsch from North Brazil. Journal of the Brazilian Chemical Society, vol. 20, n. 6, p. 1188-1192, 2009.

BROOKS, G.R.; BUTEL, J.S.; MORSE, A.S. Microbiologia Médica. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CARVALHO-JUNIOR, R. S.; MOURA, L. S.; QUISPE-CONDORI, S.; ROSA, P. T. V.; MING, L. C.; MEIRELES, M. A. A. Determination of the global yield isotherms for the system rosemary (*Rosmarinus officinalis*) + CO₂. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 6th, 2003, Versailles. Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids. Versailles:ISASF, 2003. 129-137 p.

CASTRO, H. G. *et al.* Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários. 2. ed. Viçosa: UFV, 2004a. 113 p.

CAVIN, A., POTTERAT, O., WOLFENDER, J.L., HOSTETTMANN, K., LC-UV-MS and LC-NMR of an anti-oxidant fraction from *Orophea enneandra* and the isolation of a polyacetylene, lignans and a tocopherol derivative, Journal of Natural Products, v. 61, 1998, p.1497.

CONTE, E.; MILANI, R.; MORALI, G.; ABBALLE, F. Comparison between accelerated solvent extraction and traditional extraction methods for the analysis of the herbicide diflufenican in soil. Journal of Chromatography A, v. 765, n. 1, p. 121-125. 1997.

COS, P. *et al.* Anti-infective potential of natural products; how to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". Journal of Ethnopharmacology, v. 106, 290, 2006.

COSTA, J. G. M. DA; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K.; SOUZA, E. O. DE; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, N. K. A. MOTA, M. L.; SANTOS, P. F. DOS. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, n.4, p. 583-586, 2008.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from molecules. Nature Publishing Groups, Paris, v. 432::829-837. 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. 6.ed. Wayne: NCCLS, 2003. p.53. (NCCLS document M7-A6).

CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; KERBER, V. A.; HIGASKINO, C. E. K.; CRUZ ALMEIDA, S. C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Atividade antimicrobiana do extrato

bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, v 14:: 97-103. 2004.

CURSINO, L. M. C.; MESQUITA, A.S. S.; MESQUITA, D. W. O.; FERNANDES, C. C.; PERREIRA- JUNIOR, O.L.; AMARAL, I. L.; NUNEZ, C. V. Triterpenos das folhas de *Minuartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). Revista Acta Amazonica, v. 39, nº1, 181- 186, 2009.

DADOUN, H.; MÜLLER, A. H.; CESARIO, M.; GUILHEM, J.; PASCARD, C.; Cordatin, a new diterpene from *Aparisthium cordatum*. Phytochemistry, v. 26, p. 2108-2110, 1987.

DAMASCENO, T. S. Estudo do processo de extração e avaliação alelopática dos extratos obtidos das cascas do caule do *Croton palanostigma* Klotzsch. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Area: Desenvolvimento de processos). Instituto de Tecnologia. Universidade Federal do Pará. 2012. P. 53-54.

DERRINGER, G. e SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. Journal of Quality Technology, v. 12, p. 214-219, 1980.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Product- A biosynthetic approach. 3 ed. Chichester: John Wiley e Sons Ltd, 2009. 546p.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, v.88:: 308-316. 2000.

DUARTE, M. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Revista Multiciência, v. 7, 2006.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Médica, v.64, p.711–713, 1998.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. Braz. J. Plant Physiol.,v. 18, n. 1, p. 23-36, 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4º ed. São Paulo: Atheneu, p. 63, 1988.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4º ed. São Paulo: Atheneu, 1996. Parte II, Fascículo 1.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5º Ed. Brasília. 2010.

FELIU, D. A. DE. Análise de terpenóides de espécies de *Croton* sect. *LamproCroton* (Mull. Arg) Pax (Euphorbiaceae). 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Botânica) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2011.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. L.; Box-Behnken desing: na alternative for the optimization of analytical methods. Química Nova, v. 597, p. 179-186, 2007.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R. F.; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Antifungal activity of essential oils of Croton species from the Brazilian Caatinga biome. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, p. 1383–1390, 2008.

FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2008.

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. M.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 15, p. 107-115, 2003.

GEANKOPLIS, C.J. *Transport processes and unit operations*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1993.

GUPTA, D., BLEALEY B., GUPTA, R.,. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. *Journal of Ethnopharmacology*. V.115, p.361-38,. 2008.

GURGEL, L. A.; SIDRIM, J. J. C.; MARTINS, D. T.; CECHINEL- FILHO, V.; RAO, V. S. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 97, p. 409–412, 2005.

GUTFINGER, T. Polyphenols in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 58:966-968. 1981.

HANNAY, J.B.; HOGARTH, J. ON THE Solubility of Solids in Gases, The Royal Society Publishing, London. V.20, p.324. 1876.

HART, C. A *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Serratia spp.* . Em SH Gillespie, & PM Hawkey (Eds.), *Princípios e prática de Bacteriologia Clínica* (2ª ed., Pp. 377- 386). Inglaterra, Reino Unido: John Wiley and Sons Ltd. 2006.

HAWTHORNE, B.; RIEKKOLA, M-L; SERENIUS, K.; HOLM, Y.; HILTUNEN, R.; HARTONEN, K. Comparison of hydrodistillation and supercritical fluid extraction for the determination of essential oils in aromatic plants. *Journal of Chromatography A*, v.634, p.297-308. 1993.

HAWTHORNE, B.; MILLER, D. J.; GALY, A. B.; SCHMITT, V. O. Effect of SFE flow rate on extraction rates: classifying sample extraction behavior. *Analytical Chemistry*, v.67, p.2723-2732. 1995.

HAWTHORNE, S. B.; KRIEGER, M. S.; MILLER, D. J. Analysis of flavor and fragrance compounds using supercritical fluid extraction coupled with gas chromatography. *Analytical Chemistry*, v.60, p472-477. 1998.

HAWTHORNE, S. B.; GRABANSKI, C. B.; MARTIN, E.; MILLER, D. J. Comparison of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical

water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *Journal of Chromatography A*, v.892, p.421-433.2000.

HERRMANN, A.P.; WILLEMS, M.; JANKE, H.D. Degradation of natural polyphenols by methanogenic consortia enriched from digested municipal sludge. *Water Research*, v. 35, p. 2575-2582, 2001.

HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; TOMA, W.; ALMEIDA, A. B., PAULA, A. C. B.; BRASIL, D. S. B.; MÜLLER, A. H.; SOUZA BRITO, A. R. M.; Gastroprotective effect of aparisthman, a diterpene isolated from *Aparisthmium cordatum*, on experimental gastric ulcer in rats and mice. *Phytomedicine*, vol. 8, n.2, p. 94-100, 2001.

HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; TOMA, W.; DE PAULA, A. C. B.; DE ALMEIDA, A. B. A.; BRASIL, D. S. B.; MÜLLER, A. H.; SOUZA BRITO, A. R. M.; Evaluation of the gastroprotective activity of cordatin, a diterpene isolated from *Aparisthmium cordatum* (Euphorbiaceae). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 23, n.12, p. 1465-1469, 2000a.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N.R. ; CORTEZ, D. A.G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS- FILHO, B. P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, n °7, p. 1027-1031, out. 2002.

HOLZGRABE, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2010; 57: 229-240.

HOLZGRABE, U.; DIEHL, B.; Wawer, I.; *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, 1st ed.; Elsevier: Amsterdam, 2008.

HOTTA, H, SAKAMOTO, H, Nagano, S, Osakai, T, Tsujino, Y., Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 2001.

INMETRO. DOQ-CGCRE-088 - Orientação sobre validação de métodos analíticos. Revisão 3, Rio de Janeiro: 2010.

JAY, J.M. *Microbiologia de alimentos*. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JESUS, S. P. de. Recuperação de γ -orizanol a partir de resíduo da indústria de óleo de arroz utilizando extração supercrítica: avaliação de parâmetros de processo e caracterização dos extratos. Florianópolis: UFSC, 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

LAGOS, J.B. Estudo comparativo da composição química das folhas e cascas da *Trichilia catigua* A. JUSS., Meliaceae. 2006. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2006.

LI, J. Factorial Designs. *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, v.1, p. 364-378, 2003.

KNOWLES, D. R.; RICHTER, B. E.; WYGANT, M. B.; NIXON, L.; ANDERSEN, M. R. Supercritical fluid chromatography: a new technique for Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). *Journal Association of Analytical Chemistry*, v. 71, n.3, p.451-457. 1988

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 16, p. 197-201, 2006.

LIU, R-S e TANG, Y-J. Tuber *melanosporum* fermentation médium optimization by Plackett-Burman design coupled with Draper-Lin small composite and desirability function. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 3139-3146, 2010.

LOPES, B.; BIZZO, H. R.; SÁ SOBRINHO, A. F.; PEREIRA, M. V. G.. Essential oil from leaves of *Croton sakaquinhal* Benth. *Journal of Essential Oil Research*, v. 15, n.1, pg. 48-49, 2003.

MELECCHI, M. I. S., Caracterização Química de Extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo comparativo de métodos de extração. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Química. Porto Alegre, p. 95, 2005.

MARKUS, M.A., MORRIS, B.J. Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clinical Interventions in Aging*. 3 (2), 331-339. 2008.

MEDEIROS, F.; CREPALDI, N.; TOGNOLI, L. Dermatofitos- Revisão de literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, ano VII, n.12, 2009.

MELECCHI, M. I. S. Caracterização Química de Extratos de *Hibiscus tiliacius* L: Estudo comparativo de métodos de extração. Tese de doutorado. p. 55, 2005.

MIGUEL, A.; ANDRADE, J. B. Rapid quantification of the polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosols by direct HPLC separation after ultrasonic acetonitrile extraction. *Internation Journal of Evironmental Analytical Chemistry*. v.35, p.35-41. 1989.

MONTGOMERY, D. C. *Diseño y Análiseis de Expeimentos*. México: Ibeoamérica. 1991.

MONTGOMERY, D. C. - *Introduction to Statistical Quality Control*, 4th edition, John Wiley and Sons.v. 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival.J. *Immunol. Methods*,v.65, p.55-63, 1983.

MÜLLER, A. H.; OSTER, C. B.; SHUCKMANN, W. K.; BARTL, H. Aparisthman, methyl 1-(3-furoylmethyl)-4a-hydroxy-1,2-dimethyl-2,3,4,4a,5,8,9,9a-octahydro-1H benzocycloheptene-6-carboxylate, A seven-membered ring diterpenoid from *Aparisthmiumcordatum*. *Phytochemistry*, vol. 25, n. 6, p. 1415-1417, 1986.

MUTHUKUMAR, M.: MOHAN, D. e RAJENDRAN, M. Optimization of mix proportions of mmineral aggregates using Box-Behnken desing of experiments. *Cement & Concrete Composites*, v. 25, p. 751-758, 2003.

MYERS, W. R. Response surface methodology. Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, v.1, p. 858-869, 2003.

NAVARRO, D. Estudo Químico, Biológico e Farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* na obtenção de moléculas bioativas de potencial terapêutico. Florianópolis, pg 37. 2005.

NASCIMENTO, L. D. Obtenção do óleo essencial de *Piper aduncum* L. utilizando os métodos: hidrodestilação e destilação por microondas. Trabalho de conclusão de curso em Engenharia Química. Belém: UFPA, 2011.

NEILL, SO, GOULD, KS, KILMARTIN, PA, MITCHELL, KA, MARKHAM, KR , Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. Plant Cell and Environment. 25, 539-47. 2002.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. Journal of Natural Products, v. 70, p. 461-77, 2007.

NEVES, L. C. Avaliação do método analítico para quantificação do teor de biodiesel em óleo diesel empregando a titrimetria. Dissertação de mestrado. P. 23, 2012.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C.M.S.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí, 2003.

NISTQSEMATECH e- Handbook of Statistical Methods. Disponível em <<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>>. Acesso em: 11/02/2016.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. eds SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. p. 11-24. 2. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000.

NYCHAS, G.J.E. Natural antimicrobials from plants. In: GOULD, G.W. (Ed.). New methods of food preservation . Londres: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 59-87.

OLIVEIRA, A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SANTOS, C. F.; MORAIS, S. M.; COELHO-SOUZA, A. N. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research, v. 34, n.11, p. 1471–1474, 2001a.

OLIVEIRA, L. F. C., Espectroscopia Molecular. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, n, 4, p. 24-30, 2001b.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. Química Nova, v. 32, n. 3, p. 689-702. 2009.

OMS - Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002–2005. Ginebra, WHO/EDM/TRM/2002.1

OZCAN, A.; OZCAN, A. S. Compararison os supercritical flid and Soxhlet extractions for the quantifications of hydrocarbons from *Euphorbia macroclada*. Talanta, v. 64, p. 491-495. 2004.

PALANISAMY, U. D., LING, L. T., MANAHARAN, T. Appleton, D. Rapid isolation of geraniin from Nephelium lappaceum rind waste and its anti-hyperglycemic activity. Food Chemistry. 127 (1), 21-27, 2011.

PAVIA, D.; LAMPMAN, G. & KRIZ, G. Introduction to spectroscopy, 3. ed., 2001; Philadelphia: Brooks/Cole.

PAULETTI, P. M.; ARAUJO, A.R.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M. C. M. Triterpenos de *Styrax camporum* (*styracaceae*). Revista Química Nova, v. 25, n° 3, p. 349-352, 2002.

PELLERIN, P. Supercritical fluid extraction of natural raw ma materials for the flavor and perfume industry. Perfummer and Flavorist, Wheaton, v.16, p.37-39. 1991.

PENNA, C. et al. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. Journal of Ethnopharmacology, v. 77, p. 37-40, 2001.

PINTO, R. H. H. Extração do óleo de Bacaba (*Oenocarpus bacaba*) com CO₂ Supercrítico: Parametros de processo, Perfil de Ácidos Graxos e Aplicação na Síntese de nanopartículas de Fe₃O₄.

POKORNY, J.; KORCZAK, J. Preparation of Natural antioxidants. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. Antioxidants in food: practical applications. New York: CRC Press, 2001. p. 311-330.

PORTAL ACTION. Disponível em <<http://www.portalaction.com.br>>. Acesso em 18 de Novembro de 2016.

RAJESH, R., et al. Purification and characterization of 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot, Biochimie v. 88, p. 1313–1322, 2006.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.J.; BOLWELL, G.P., et al. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic. Free Radical Research, v. 22, 1995, p. 375-383.

RISCO, E.; GHIA, F.; IGLESIAS, J.; ALARREZ, E.; CANIGUEAL, S.. Immuno modulatory activity and chemical characterization o Sangre de Drago (Dragon's Blood) from *Croton lechleri*. Plana Medica. v.69, n.9, p785-794, 2003.

ROCHA, D. P.; PINTO, G. F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C. A.; GUERRA, W.; FONTES, A. P. S.; TAVARES, T. T.; MARZANO, I. M.; PEREIRA-MAIA, E. C. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. Química Nova, v. 34, n. 1, p. 111-118, 2011.

RODRIGUES, C. C. Quantificação de polifenóis totais, determinação da capacidade antioxidante e da atividade antimicrobiana do extrato da casca do *Croton Palanostigma* Kl. Trabalho de Conclusão de Curso. 2013. P 32.

RODRIGUES, M. R. A. Estudos dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano. Tese de doutorado em Química. Porto Alegre: UFRGS, 2002.

RODRIGUEZ, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2 ed. Campinas, SP, 2009.

RON, B.H.; WILLS, K.B.; MORGAN, M. Herbal products: active constituents, modes of action and quality control. Nutrition Research Reviews, v. 36, p. 65-71, 2000.

SALATINO, A.; SALTINO, M.L.F.; NEGRI, G. 2007. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). Journal of the Brazilian chemical society 18(1):11-33.

SANDOVAL, M.; AYALA, S.; ORÉ, M.; VALDIVIESO, L.; LOLI, R.; RICRA, V; HUAMAN, O. Evaluación de la toxicidad hepática y renal aguda y subaguda del látex de *Croton palanostigma* (Sangre de Grado) en animales de experimentación. Anales de La Facultad de Medicina, vol. 66, n. 2, p. 119-126, 2005.

SANTANA, V. S., Estudo comparativo de óleos essenciais de espécies de *Croton* do estado de Segipe – 2011, pg. 28, Dissertação (Mestrado em Química no Programa de Pós-graduação em Química) – Universidade Federal de Sergipe. 2011

SANTOS, M.S. e COLNAGO, L.A. Validação de método quantitativo por RMN de ¹H para análises de formulações farmacêuticas. Química Nova, 2013; 36 (2): p. 324-330.

SARGENTI, S. R.; LANÇAS, F. M. Influence of the extraction mode and temperature in supercritical fluid extraction of brazilian citrus. Part i. Riva Del Garda, 1994. P. 1800-1812. International Symposium on Capillary Chromatography, 16. Riva Del Garda. 1994.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SECCO, R. de S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) na Amazônia brasileira: um ensaio taxonômico. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2008. 169 p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental. 5.ed. Porto Alegre-RS: Bookman, 2002. 836 p.

SIMIONATTO, E. BONANI, V. F. L.; MOREL, A. F.; POPPI, N. R.; JÚNIOR, J. L. R.; Z. STUKER, C. Z.; PERUZZO, G. M.; MARIZE, T. L. P. PERES, M. T. L. P.; HESS, S. C.; Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Bailon (Euphorbiaceae) Stem Bark. Journal of the Brazilian Chemical Society. v.18, N. 5, p. 879-885, 2007.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A. A., PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2004.

SOARES, L. A. L.; GONZÁLEZ, O. G.; PETROVICK, P. R.; BASANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) empregando planejamento fatorial. Cad. Farm., v.14, n.1/2, p.21-26, 1998.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M. C. C; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova, v. 30: 351-355. 2007.

SOUZA, M.A., et al. Isolation and partial characterization of d-galactose-binding lectin from the latex of *Synadenium carinatum*, Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 48, p. 705-716, 2005.

TAVEIRA, C.C. Ação antimicrobiana de extrato de plantas do Cerrado e isolamento de substâncias ativa de *Kielmeyera coriácea*. 2007. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas no Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas)- Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

TREASE, G. E.; EVANS, W. C. Pharmacognosy. 14.ed. London: W. B. Saunders, 1996. 120p.

WEN, A.; DELAQUIS, P.; STANICH, K.; TOIVONEN, P. Antilisterial activity of selected phenolic acids. Food Microbiol., v. 20, p. 305-311, 2003.

WILMES, A., CREAN, D., AYDIN, S., PFALLER, W., JENNINGS, P., LEONARD, M.O. Identification and dissection of the Nrf2 mediated oxidative stress pathway in human renal proximal tubule toxicity. Toxicology in Vitro. 25 (3), 613-622. 2011.