



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS - ICEN  
FACULDADE DE QUÍMICA - FAQUI

ALEXANDRE AUGUSTO MORAES DE SOUZA

**ESTUDO DE QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS, AVALIAÇÃO  
DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DA CASCA DO  
CAULE DO *Croton cajucara* BENTH**

BELÉM - PA

2017

ALEXANDRE AUGUSTO MORAES DE SOUZA

**ESTUDO DE QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS, AVALIAÇÃO  
DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DA CASCA DO  
CAULE DO *Croton cajucara* BENTH**

Trabalho de Conclusão de Curso encaminhado  
ao Instituto de Ciências Exatas e Naturais da  
Universidade Federal do Pará, como parte das  
exigências para a obtenção do título de  
Bacharel em Química Industrial.

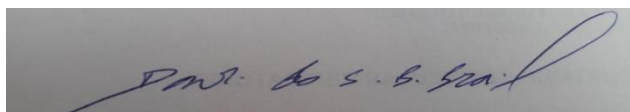
DATA DA AVALIAÇÃO:

07/12/2017

CONCEITO:

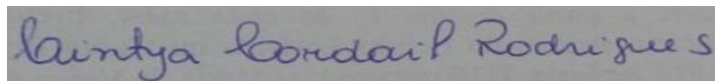
EXCELENTE

**BANCA EXAMINADORA**



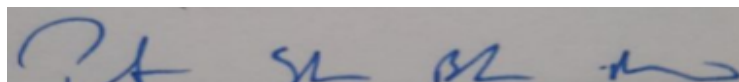
---

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



---

Ma. Cintya Cordovil Rodrigues  
(PRODERNA/ITEC/UFPA/Co-orientadora)



---

Profª. Drª. Patrícia Santana Barbosa Marinho  
(FAQUI/ICEN/UFPA)



---

Ma. Dayse Lúcia do Nascimento Brandão  
(PPGCF/ICS/UFPA)

Dedico este trabalho a Deus, minha família, amigos e minha namorada Sônia, os quais sempre me deram forças para chegar aqui. O companheirismo de vocês foi essencial para minha formação. Obrigado!

## AGRADECIMENTOS

Ao **Deus Pai**, por nunca me abandonar, sempre que baixava minha cabeça e me sentia fraco, Tu me acolhias e dizias para eu continuar, que tudo ia ficar bem. Obrigado pela oportunidade de estar aqui, realizando meus sonhos e tornando pessoas mais felizes.

Aos meus pais biológicos **Keila da Conceição Moraes** (*in memorian*) e **Aldenor Fonseca de Souza** (*in memorian*) pelo dom da vida. Um dia nos encontraremos e mataremos toda essa saudade que guardamos em nossos corações.

Aos meus pais do coração **Conceição do Socorro Alves Souza** e **Cleodir da Conceição Moraes**. Vocês são incríveis. Pessoas cheias de perspectivas, energias positivas e batalhadores. Obrigado por terem cuidado tanto de mim. Obrigado por seus apoios incondicional. Seus conselhos e ensinamentos me tornaram o homem que sou. Vocês estarão sempre no meu coração. Agradeço a Deus ter me concedido viver tudo que vivi com vocês.

Aos meus avós, **Lucila Maria da Conceição Moraes** e **Benedito Ribeiro de Moraes**, minha tia, **Diane Cristina da Conceição Moraes** e irmã, **Patrícia Kelly Alves Matos** pela dedicação e empenho em minha criação, por sempre acreditarem em mim.

A minha família, **Antônio Souza**, **Danilo Furriel**, **Leandro Bragança**, **Luma Bragança**, **Rosângela Lopes**, **Pedro Lopes**, **Arilson Oliveira**, **Lucas Oliveira**, **Daniel Oliveira**, **Kleber Moraes**, **Selma Cristina** e **Silvio Souza**, pelo amor que vocês me dão, por me abraçarem em momentos difíceis, por não terem me deixado desistir. Igual a vocês não há.

À minha namorada e melhor amiga **Sônia Maria de Freitas Almeida**, por todo o conhecimento transmitido, companheirismo, determinação, pelo seu carinho, por tantos momentos felizes vividos. Sua ajuda foi crucial para eu estar aqui. É uma honra ser seu namorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Davi do Socorro Barros Brasil** pela oportunidade de mostrar um pouco do que sei para a sociedade. Sem você nada disso teria acontecido.

À minha amiga e Co-orientadora **Ma. Cintya Cordovil Rodrigues** por ter confiando tanto em mim. Sempre que necessitava de algo você estava lá para me ajudar.

Aos professores **Shirley Cabral**, **Rui Nelson**, **Caroline**, **Patrícia Marinho**, **Vanessa Albres** e **Luíza Pires**, por compartilharem de seus conhecimentos, vocês me deram ânimo para continuar nessa jornada.

Às minhas amigas, **Dayse Lúcia do Nascimento Brandão**, **Elza Brandão Santana**, **Rafaela Oliveira Pinheiro** e **Samara de Paula Pinheiro Menezes Marques** sempre assíduas em suas responsabilidades, determinadas, gentis e atenciosas.

Aos grandes amigos **Bruna Lima**, **Mariano Henrique**, **Pamela Lima**, **Maiana Maia**, **Felipe Gomes**, **Patrick Cruz**, **Fabiana Nascimento**, **Pamella Cristiny** e **Jonathas Brito**, por tudo que passamos juntos.

Aos amigos de laboratório **Nayara Silva**, **Alefhe Bernard**, **Letícia Siqueira**, **Ronaldo Pessoa**, **Bruna Amanda**, **Fábio Bruno**, **Rafael Maia**, **Andréia Ribeiro**, **Augusto Freitas** e **Sarah Vasconcelos**. Amo vocês.

## SUMÁRIO

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b>  | <b>13</b> |
| <b>2</b>     | <b>OBJETIVOS</b>   | <b>15</b> |
| 2.1          | OBJETIVO GERAL   | 15        |
| 2.2          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS  | 15        |
| <b>3</b>     | <b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b>   | <b>16</b> |
| 3.1          | A FAMÍLIA <i>EUPHORBIACEAE</i>   | 16        |
| 3.2          | CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>CROTON</i>   | 16        |
| 3.3          | <i>CROTON cajucara</i> BENTH   | 18        |
| 3.4          | COMPOSTOS FENÓLICOS  | 21        |
| 3.5          | ATIVIDADE ANTIOXIDANTE   | 24        |
| 3.6          | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA   | 25        |
| <b>4</b>     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>  | <b>28</b> |
| 4.1          | MATERIAL   | 28        |
| <b>4.1.1</b> | <b>Obtenção do material botânico</b>   | <b>28</b> |
| <b>4.1.2</b> | <b>Solventes e reagentes</b>   | <b>29</b> |
| 4.2          | MÉTODOS  | 29        |
| <b>4.2.1</b> | <b>Determinação da Umidade residual</b>  | <b>29</b> |
| <b>4.2.2</b> | <b>Análise Granulométrica</b>  | <b>29</b> |
| <b>4.2.3</b> | <b>Caracterização do material botânico</b>   | <b>30</b> |
| <b>4.2.4</b> | <b>Planejamento Experimental da Extração</b>   | <b>30</b> |
| 4.2.4.1      | Extração Convencional  | 30        |
| 4.2.4.2      | Operação do equipamento  | 32        |
| <b>4.2.5</b> | <b>Cálculo do rendimento dos extratos (%)</b>  | <b>34</b> |
| 4.3          | QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS   | 34        |
| 4.4          | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE  | 36        |
| 4.5          | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  | 36        |
| <b>4.5.1</b> | <b>Preparo dos meios de cultura</b>  | <b>37</b> |
| <b>4.5.2</b> | <b>Método de microdiluição para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</b> | <b>37</b> |
| <b>5</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>  | <b>39</b> |
| 5.1          | ESTUDOS FARMACOLÓGICOS   | 39        |
| <b>5.1.1</b> | <b>Determinação da Umidade do <i>C. cajucara</i></b>                                       | <b>39</b> |
| <b>5.1.2</b> | <b>Análise Granulométrica da Casca do <i>C. cajucara</i></b>                               | <b>39</b> |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 5.2     | ESTUDOS FITOQUÍMICOS   | 40 |
| 5.2.1   | Análise do Rendimento  | 40 |
| 5.2.1.2 | Análise estatística para a variável de resposta Rendimento (RD)          | 42 |
| 5.2.2   | Quantificação de Compostos Fenólicos                                     | 46 |
| 5.2.2.1 | Análise estatística para a variável de resposta Compostos Fenólicos (CF) | 48 |
| 5.2.3   | Avaliação da Atividade Antioxidante                                      | 52 |
| 5.2.3.1 | Análise estatística da variável antioxidante (AA)                        | 53 |
| 5.2.4   | Avaliação da Atividade Antimicrobiana                                    | 55 |
| 5.2.5   | Função Desjesabilidade   | 56 |
| 6       | CONCLUSÃO  | 60 |
| 7       | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS   | 61 |
| 8       | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS   | 62 |

## RESUMO

O presente trabalho teve como foco principal analisar o rendimento (em base seca), quantificar os compostos fenólicos, avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos da casca do caule do *Croton cajucara* BENTH. Para isso, realizou-se uma extração convencional utilizando um extrator de aço-inox o qual seguiu o planejamento experimental (Box Hunter e Hunter) de dois fatores e dois níveis, sendo eles a temperatura (50°C e 60°C) e granulometria (0,10 mm e 0,51 mm) do material botânico, para determinar quais variáveis influenciaram no processo de extração. Para a quantificação de compostos fenólicos foi usada a metodologia de Folin-Ciocalteu, para a análise da atividade antioxidante aplicou-se o método do IC<sub>50</sub> e para a análise antimicrobiana empregou-se o método de microdiluição, para a indicação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente cepas bacterianas, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi*, bem como cepa fúngica, *Candida albicans*. Os rendimentos máximo e mínimo foram, respectivamente para as corridas 6 (T = 60°C; G = 0,10 mm) com 9,11% e 5 (T = 50°C; G = 0,10 mm) com 5,15%. Na quantificação de compostos fenólicos o ensaio 4 (T = 60°C; G = 0,51 mm) apresentou valor máximo e o ensaio 6 (T = 60°C; G = 0,10 mm) mínimo, onde forneceram 50,32 e 26,98 mg EAG/g, respectivamente. Em relação a atividade antioxidante os resultados foram expressos em IC<sub>50</sub> e variaram de 9,01% (Ensaio 6; T = 60°C; G = 0,10 mm) à 14,03% (ensaio 7; T = 50°C; G = 0,51 mm). Já para a atividade antimicrobiana, os extratos não inibiram o crescimento das bactérias e fungo testados, apresentando uma CIM > 1.000 µg/mL. Todos os resultados foram tratados estatisticamente e, de modo geral, comprovaram que as melhores condições de extração foram T= 60°C e G = 0,10 mm.

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

## ABSTRACT

The main objective of this work was to analyze the yield (on a dry basis), to quantify the phenolic compounds, and to evaluate antioxidant and antimicrobial the activity of *Croton cajucara* BENTH stem bark extracts. For this, a conventional extraction was carried out using a stainless steel extractor which followed the experimental planning (Box Hunter and Hunter ) of two factors and two levels, being the temperature (50 °C and 60 °C) and granulometry (0,10 mm and 0,51 mm) of the botanical material, to determine which variables influenced in the extraction process. To the quantification of phenolic compounds was used the methodology of Folin-Ciocalteu for the analysis of the antioxidant activity the IC<sub>50</sub> method was applied and for the antimicrobial analysis the microdilution method was employed to indicate the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against the bacterial strains, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi*, as well as fungal strain, *Candida albicans*. The maximum and minimum yields were respectively to the runs 6 (T = 60 °C, G = 0,10 mm) with 9.11% and 5 (T = 50 °C, G = 0,10 mm) with 5.15%. In the quantification of phenolic compounds, run 4 (T = 60 °C, G = 0,51 mm) showed a maximum value and the minimum was the 6 (T = 60 °C, G = 0,10 mm), with 50.32 and 26.98 mgEAG/g, respectively. In relation to the antioxidant activity, the results were expressed as IC<sub>50</sub> and ranged from 9,01 % (Test 6, T = 60 °C, G = 0,10 mm) to 14.03% (test 7, T = 50 ° C; G = 0,51 mm). For the antimicrobial activity, the extracts did not inhibited the growth of the bacterias and fungus tested, presenting a MIC > 1.000 µg/mL. All the results were treated statistically and, in general, proved that the best extraction conditions were T = 60 ° C and G = 0,10 mm.

**Key words:** *Croton cajucara* BENTH; Extraction; Natural Product.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                    |  |
|--------------------|--|
| %                  | Porcentagem  |
| $\Sigma$           | Somatório  |
| p.                 | Página   |
| °C                 | Graus Celsius  |
| $\mu\text{g}$      | Micrograma   |
| $\mu\text{L}$      | Microlitro   |
| AA                 | Atividade Antioxidante   |
| AAA                | Triterpeno ácido acetilaleuritólico                                      |
| ABTS               | Sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzenotiazolina6-sulfônico) |
| ATCC               | <i>American Type culture collection</i>                                  |
| BHA                | Butil-hidroxianisol  |
| BHT                | Butil-hidroxi-tolueno  |
| <i>C. albicans</i> | <i>Candida albicans</i>  |
| CcB                | <i>Croton cajucara</i> BENTH   |
| c-CJC-B            | <i>Cis</i> -cajucarina B   |
| CF                 | Compostos Fenólicos  |
| CIM                | Concentração inibitória mínima   |
| CJC-A              | Cajucarina A   |
| CJCR               | Cajucarinolida   |
| cm                 | Centímetro   |
| CTN                | <i>Trans</i> -crotonina  |
| DCTN               | <i>Trans</i> -desidrocrotonina   |
| DPPH               | 2,2-difenil-1-pecrilidrazil  |
| <i>E. Coli</i>     | <i>Echerichia Coli</i>   |
| EAG                | Equivalente Ácido Gálico   |
| EMBRAPA            | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária                              |
| g                  | Gramas   |
| G                  | Granulometria  |
| H                  | Horas  |

|                      |                                       |
|----------------------|---------------------------------------|
| H <sup>+</sup>       | Íon hidrogênio                        |
| Hz                   | Hertz                                 |
| ICJCR                | Iso-cajucarinolida                    |
| ISCR                 | Isosacacarina                         |
| IV                   | Espectroscopia no Infravermelho       |
| K <sup>+</sup>       | Íon potássio                          |
| KBr                  | Brometo de potássio                   |
| Kg                   | Kilograma                             |
| L                    | Litro                                 |
| m/s                  | Relação massa/solvente                |
| mg                   | Miligrama                             |
| MHC                  | Caldo Muller-Hinton                   |
| min                  | Minuto                                |
| mL                   | Mililitro                             |
| mm                   | Milímetro                             |
| Mm                   | Milimolar                             |
| MSR                  | Metodologia de Superfície de Resposta |
| MTT                  | Sal de tetrazólio                     |
| NaCO <sub>3</sub>    | Carbonato de Sódio                    |
| Nm                   | Nanômetro                             |
| P. A.                | Puro para análise                     |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>         |
| <i>P. mirabilis</i>  | <i>Proteus mirabilis</i>              |
| pH                   | Potencial de Hidrogênio               |
| R <sup>2</sup>       | Coefficiente de Determinação          |
| Rd                   | Rendimento                            |
| <i>S. aureus</i>     | <i>Staphylococcus aureus</i>          |
| <i>S. typhi</i>      | <i>Salmonella typhi</i>               |
| SA                   | Sem Atividade                         |
| t                    | Tempo                                 |
| t-CJC-B              | <i>Trans</i> -cajucarina B            |
| UV                   | Ultravioleta                          |
| vis.                 | Visível                               |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Folha do <i>Croton Cajucara</i> BENTH  | 19 |
| <b>Figura 2.</b> Cascas do caule do <i>Croton Cajucara</i> BENTH  | 20 |
| <b>Figura 3.</b> Estruturas isoladas da casca do caule do <i>Croton cajucara</i> BENTH                            | 21 |
| <b>Figura 4.</b> Exemplos de flavonoides comumente encontrados. (A) catequinas e (B) antocianinas.                | 23 |
| <b>Figura 5.</b> Moléculas dos (A) ácidos hidrocínâmico e do (B) hidroxibenzóico                                  | 23 |
| <b>Figura 6.</b> Processo Antioxidativo. (A) reação para capturar o DPPH e (B) alteração de coloração.            | 25 |
| <b>Figura 7.</b> Material coletado  | 28 |
| <b>Figura 8.</b> Casca do caule do <i>Croton cajucara</i> BENTH   | 29 |
| <b>Figura 9.</b> Exsicata preparada para identificação de sua espécie   | 30 |
| <b>Figura 10.</b> Sistema para extração: Reator de aço-inox e banho termostático                                  | 32 |
| <b>Figura 11.</b> Evaporador rotativo em funcionamento  | 33 |
| <b>Figura 12.</b> Calibração com Ácido Gálico para o teste de quantificação de compostos fenólicos                | 35 |
| <b>Figura 13.</b> Placa com 96 orifícios utilizada para a determinação de CIM                                     | 38 |
| <b>Figura 14.</b> Gráfico da Distribuição Granulométrica da casca do caule do <i>C. cajucara</i> BENTH            | 40 |
| <b>Figura 15.</b> Gráfico de Pareto para a resposta Rendimento  | 43 |
| <b>Figura 16.</b> Gráfico da Distribuição dos resíduos para o Rendimento  | 44 |
| <b>Figura 17.</b> Gráfico do Teste de Normalidade para rendimento   | 45 |
| <b>Figura 18.</b> Gráfico da Superfície de Resposta para o Rendimento   | 46 |
| <b>Figura 19.</b> Curva de Nível para Rendimento  | 46 |
| <b>Figura 20.</b> Gráfico de Pareto para a resposta Compostos Fenólicos   | 49 |
| <b>Figura 21.</b> Gráfico da Distribuição dos resíduos em função dos valores preditos para os Compostos Fenólicos | 50 |
| <b>Figura 22.</b> Gráfico do Teste de Normalidade para Compostos Fenólicos  | 51 |
| <b>Figura 23.</b> Gráfico da Superfície de Resposta para os Compostos Fenólicos                                   | 51 |
| <b>Figura 24.</b> Curva de Nível para Compostos Fenólicos   | 52 |
| <b>Figura 25.</b> Absorbâncias das amostras vs tempos de análises   | 52 |

**Figura 26.** Gráfico de Pareto para a resposta Atividade Antioxidante 54

**Figura 27.** Valores preditos para as variáveis de resposta Rendimento e 58  
Compostos Fenólicos e função desejabilidade

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Algumas espécies do gênero <i>Croton</i> ocorrentes no Brasil  | 17 |
| <b>Tabela 2.</b> Variáveis de entrada e seus níveis   | 31 |
| <b>Tabela 3.</b> Matriz de experimentos com parâmetros variáveis  | 31 |
| <b>Tabela 4.</b> Dados utilizados para os cálculos do Diâmetro médio de Sauter  | 39 |
| <b>Tabela 5.</b> Resultados da variável de resposta Rendimento  | 41 |
| <b>Tabela 6.</b> Efeitos estimados para Rendimento  | 42 |
| <b>Tabela 7.</b> Análise de variância (ANOVA) para a variável de resposta Rendimento  | 43 |
| <b>Tabela 8.</b> Coeficientes de regressão para a variável de resposta Rendimento   | 44 |
| <b>Tabela 9.</b> Resultados da variável de resposta Compostos Fenólicos   | 47 |
| <b>Tabela 10.</b> Efeitos estimados para Quantificação dos Compostos Fenólicos  | 48 |
| <b>Tabela 11.</b> ANOVA para Quantificação dos Compostos Fenólicos  | 48 |
| <b>Tabela 12.</b> Coeficientes de regressão para a variável de resposta Compostos Fenólicos                                       | 50 |
| <b>Tabela 13.</b> Resultados da variável de resposta Atividade Antioxidante   | 53 |
| <b>Tabela 14.</b> ANOVA para Atividade Antioxidante   | 54 |
| <b>Tabela 15.</b> Resultados da Concentração Inibitória Mínima  | 55 |
| <b>Tabela 16.</b> Parâmetros utilizados na otimização das respostas Rendimento e Compostos Fenólicos                              | 57 |
| <b>Tabela 17.</b> Respostas rendimento, Compostos fenólicos, Atividade antioxidante e antimicrobiana para a extração convencional | 59 |

## 1 INTRODUÇÃO

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

A utilização de plantas como medicamento está fundamentada, portanto, em estudos etnofarmacológicos que, partindo do uso tradicional e do conhecimento popular sobre as propriedades farmacológicas de certos vegetais, indicam o potencial para o desenvolvimento de novos fitoterápicos. Neste contexto, as plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais podem-se utilizar para a síntese de inúmeros fármacos (SCOPEL, 2005).

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

Segundo Nogueira (1983), em regiões tropicais da América Latina existem diversas espécies medicinais de utilidade local, possibilitando uma relação custo-benefício bem pequena para a população, gerando vitalidade para os mesmos. Dentre elas, destacam-se as espécies de *Euphorbiaceae*, nas quais apresentam uma grande importância na atividade econômica, através da alimentação humana e na medicina a partir do conhecimento popular (TRINDADE, 2015).

A espécie *Croton cajucara* BENTH (CcB) pertencente à família *Euphorbiaceae* é encontrada com frequência na Região Amazônica. Esta é conhecida como “Sacaca” que significa “feitiço” na língua Tupi, e apresenta um grande valor medicinal no tratamento de diversas doenças. A folha e a casca do caule desse vegetal são utilizadas de forma empírica pelo homem na forma de chá, para o tratamento de doenças como: diabetes, diarreia, malária,

febre, distúrbios gastrintestinais, renais, hepáticos e no controle de elevados níveis de colesterol. (DI STASI et al., 1989).

A Amazônia exibe uma extensa variedade de espécies vegetais nativas e exóticas, tendo em sua maioria importância econômica agregada, entretanto, poucas espécies são analisadas e descritas em publicações científicas. Com isso deve-se considerar a comercialização de extratos obtidos a partir dos vegetais, nos quais são ricos em substâncias que apresentam potencial antioxidante e antimicrobiano como estratégia de desenvolvimento da região. Todavia, a aplicação desses produtos deve ser precedida de estudos que avaliem fatores como: identificação, isolamento, toxicidade e a eficácia do princípio ativo (como compostos fenólicos), formas de aplicações e a produção a nível industrial (BRAZ-FILHO, 1999 & SILVA et al., 2005).

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

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

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

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo visa avaliar os rendimentos, potenciais antioxidantes e antimicrobianos, bem como quantificar os compostos fenólicos presentes nos extratos obtidos da casca do caule do vegetal *Croton cajucara* BENTH, validando suas crenças empíricas e observando seu poder frente a microrganismos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estudar o processo de extração sólido-líquido das cascas do caule de *C. cajucara* BENTH utilizando álcool etílico como solvente, a partir do planejamento experimental Box Hunter e Hunter;
- b) Analisar os rendimentos dos extratos;
- c) Quantificar os compostos fenólicos totais dos extratos, utilizando o método de Folin-Ciocalteu;
- d) Estabelecer seu potencial antioxidante pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila);
- e) Avaliar a atividade microbiológica dos extratos, utilizando o método de microdiluição para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM).

### 3 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

#### 3.1 A FAMÍLIA *EUPHORBIACEAE*

*Euphorbiaceae* é a família mais representativa dentre as Angiospermas, predominando em regiões subtropicais e tropicais, apesar de apresentar membros em regiões de todo o planeta, exceto nas regiões mais frias como o Ártico. Levantamentos florísticos afirmam que há uma alta distribuição das *Euphorbiaceae* em ecossistemas brasileiros, como cerrado, mata atlântica, caatinga e campos rupestres (CORDEIRO, 1993; HARLEY, 1995; FERRAZ, 1996; PAIVA JR. et al., 2000; SANTOS et al., 2000).

Espécies pertencentes à família *Euphorbiaceae* merecem destaque na medicina popular e econômica, especialmente na alimentação humana, produção de látex (borrachas), óleos utilizados na indústria de tintas, plásticos, sabões duros, fibras sintéticas, pigmentos para tecidos, perfumes, batons e lubrificantes de motores e turbinas especialmente os extraídos de espécies do gênero *Ricinus communis* L. (MACHADO, 2007).

Estudos físico-químicos revelaram que diversas espécies da família *Euphorbiaceae* mostraram a presença de compostos químicos biologicamente ativos variados, tais como flavonoides, saponinas, terpenoides (di e triterpenoides), ésteres, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, taninos, lecitinas e glicoproteínas (BITTNER et al., 2001; SOUZA et al., 2005; ROGÉRIO et al., 2007; RAJESH et al., 2006).

#### 3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *CROTON*

O gênero *Croton* pertence à família *Euphorbiaceae* e ordem *Malpighiales* (MACIEL, 1997; BREMER, 2009). Ocorre em abundância em todo o planeta, com concentração significativa na África, México e Brasil, com expressiva ocorrência na Amazônia (MACIEL et al., 2013). É uma das mais diversificadas e complexas entre as Angiospermae, com aproximadamente 8.000 espécies (LIMA, 2006). Este é muito comum em áreas de vegetação secundária, estando entre os dez mais abundantes, na América do Sul, com aproximadamente 750 espécies (VAN EE et al. 2011; GOMES-POMPA, 1971). No Brasil habitam 316 espécies do gênero, incluindo ervas, arbustos e árvores (**Tabela 1, p. 17**) (CORDEIRO et al., 2014).

**Tabela 1.** Algumas espécies do gênero *Croton* ocorrentes no Brasil

|   |  |   |
|---|--|---|
| <i>C. abegghii</i> Urb. & Ekman<br><i>C. antisyphiliticus</i> Mart.<br><i>C. argyrophylloides</i> Muell Arg.  | <i>C. inaequilobus</i> Steyererm   | <i>C. piptocalyx</i> Müll. Arg.<br><i>C. priscus</i> Croizat<br><i>C. pullei</i> Lanjouw  |
| <i>C. cajucara</i> Benth<br><i>C. caperoniifolius</i> Müll. Arg.<br><i>C. campestris</i> A. St<br><i>C. celtidifolius</i> Baillon<br><i>C. cordifolius</i> Baillon<br><i>C. crustulifer</i> Croizat<br><i>C. cuneatus</i> Klotz | <i>C. jacobinensis</i> Baillon<br><i>C. junceus</i> Baillon  | <i>C. rhamnifolius</i> Kunth  |
| <i>C. echioides</i> Baillon<br><i>C. essequiboensis</i> Klotzsch  | <i>C. maracayuensis</i> Chodat & Hassler<br><i>C. matourensis</i> Aubl.<br><i>C. micans</i> Baillon<br><i>C. microgyne</i> Croizat<br><i>C. mucronifolius</i> Müll. Arg. | <i>C. sacaquinha</i> Benth<br><i>C. salutaris</i> Casar<br><i>C. sampatik</i> Müll. Arg.<br><i>C. septotubensis</i> Hochne<br><i>C. sincorensis</i> Mart. ex Muell Arg.<br><i>C. sonderianus</i> Müll. Arg.<br><i>C. sphaerogynus</i> Baillon |
| <i>C. glechomifolius</i> Müll. Arg.<br><i>C. goyazensis</i> Müll. Arg.<br><i>C. gracilescens</i> Müll. Arg.   | <i>C. nepetifolius</i> Baillon<br><i>C. nummularius</i> Baillon  | <i>C. tessmannii</i> Mansf<br><i>C. tetradenius</i> Baillon   |
| <i>C. hemiargyreus</i> Muell Arg.<br><i>C. heterocalyx</i> Baillon  | <i>C. ocalia</i> Klotzsch<br><i>C. organensis</i> Baillon  | <i>C. urucurana</i> Baill<br><i>C. zehntneri</i> Pax e Hoffm  |

Fonte. CORDEIRO et al., 2014

De acordo com a classificação de Webster (1994), o gênero pertence à Tribo Crotonae e, apesar do expressivo número de espécies, aparentemente seria um táxon monofilético, no qual é pertencente à subfamília Crotonoideae (WEBSTER; 1992). Todavia, estudos realizados por Berry et al. (2005), demonstraram que *Croton* não era monofilético.

Os vegetais pertencentes ao gênero *Croton* estão chamando muita atenção dos cientistas, uma vez que a variedade de usos medicinais nas diferentes regiões do mundo é proporcional a toda variabilidade inerente ao gênero. Para o tratamento de diversas patologias, como diabetes, colesterol alto, problemas gastrointestinais, leucemia, reumatismo, diarreia, anorexia, hepatite, obesidade, problemas respiratórios, como antiinflamatório, analgésico e até mesmo adoçante. São utilizadas diversas partes desta planta, destacando-se cascas, folhas, raízes e sementes (SALATINO et al., 2007).

Estudos sobre o potencial farmacológico dos extratos ou compostos isolados das espécies de *Croton* são muito importantes, uma vez que existe uma diversidade de usos na medicina popular tradicional ou terapias alopáticas. Observando através da quimiotaxonomia, a grande variedade de compostos encontrados nessas plantas pode prover também características diagnósticas de determinados grupos ou espécies. A diversidade inerente ao

gênero se reflete na descoberta de novas estruturas como, novas classes de diterpenos (HELUANI et al., 2000) e alcaloides (ARAUJO JUNIOR et al., 2005).

Estudos utilizando espécies da família *Euphorbiaceae* revelaram a presença de diversos compostos de caráter químico biologicamente ativos, dentre eles destacam-se os terpenoides. (BITTNER et al., 2001; SOUZA et al., 2005; HAESBAERT & LIMONAD 2007; RAJESH et al., 2006). Esses possuem os esqueletos: cembranoides, clerodanos, neoclerodanos, halimanos, isopimaranos, cauranos, sarcopetalanos, labdanos, ésteres do forbol e traquilobanos (BLOCK et al. 2005).

Diversas espécies do gênero *Croton* apresentam funções químicas do tipo aromáticos em sua estrutura. Dentre elas, podemos destacar os 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 apresenta propriedades medicinais, podendo apresentar coloração avermelhada e conter pró-antocianidinas e/ou alcaloides (SANDOVAL et al. 2005; RISCO et al. 2003). Outros metabólitos frequentemente relatados são os triterpenos e compostos fenólicos, como flavonoides, lignoides e pró-antocianidinas (SALATINO et al. 2007; BARRETO et al. 2013).

### 3.3 *CROTON cajucara* BENTH

Segundo Maciel (2002), o uso de plantas para fins medicinais é muito comum, tornando verídicas as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante vários séculos. De acordo com isso, esse tipo de modalidade de cultura medicinal estimula o grande interesse de diversos cientistas em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como botânica e farmacologia, que em conjunto enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial.

*Croton cajucara* BENTH (CcB), usualmente denominado como “sacaca”, que na língua Tupi significa “feitiço”, é utilizado como planta medicinal para tratamento de diversas doenças. Sua árvore pode chegar entre 6 a 10 metros de altura, sendo predominante na Região Amazônica, tendo como centro de dispersão o Estado do Pará. Apresenta propriedades de erva daninha e é considerada uma planta de crescimento secundário no qual habita terras abandonadas e clareiras recentes. Ademais, é constantemente encontrada em várzeas altas. Adapta-se, com facilidade, em solos como de argila amarela de fertilidade muito baixa. Ou

seja, é uma árvore que não necessita de solos ricos e é resistente a pragas (MACIEL et al, 2002; MACIEL et al., 1998a; TIEPPO, 2007).

Porta madeira branco-amarelada com cascas aromáticas, folhas inteiras e simples (**Figura 1**), pecioladas, estipuladas, lanceoladas, peninérveas, verdes com limbos divididos em lobos ou segmentos, inflorescência racemosa com flores de sexo separado, fruto seco, esquizocárpico, separando-se em 3 cocos, bem como sementes ricas em endosperma (TIEPPO, 2007; DI STASI, 1988; VAN DEN BERG et al.,1982). Têm racemos terminais com nove centímetros de comprimento, têm-se sete flores femininas na base e doze masculinas na porção mediana terminal, de cor amarelada. Em relação aos frutos são cápsulas globosas de um pouco menos de um centímetro de comprimento, onde há uma semente em cada carpelo. A planta multiplica-se apenas por sementes (LORENZI et al., 2002; TIEPPO, 2007).

**Figura 1.** Folha do *Croton cajucara* BENTH



**Fonte.** LORENZI, 2002.

Em algumas regiões do Norte, mais especificamente no Estado do Pará, as folhas e cascas de caule do *C. cajucara* são empregadas para combater diabetes, diarreia, malária, febre, problemas estomacais, inflamação do fígado, rins, vesícula e no controle de índices elevados de colesterol. Esta planta também é comercializada em algumas farmácias de manipulação e, nesta situação o pó das cascas do caule é vendido em cápsulas. Folhas da sacaca são vendidas em feiras livres da cidade de Belém-PA, para o tratamento de incômodos no fígado, pois esta auxilia na digestão principalmente após ingestão de alimentação rica em gorduras. Usualmente, o pó das folhas é vendido com indicação hepatoprotetora, para

tratamento do diabetes e em dietas de emagrecimento (MACIEL et al., 2007a; 2007b; 2006a; 2002a; 2002b; 1998a; VEIGA JR. et al., 2005; SOARES, 2004; LEAL, 2008).

Apesar do *CcB* apresentar uma gigantesca representatividade na medicina tradicional, no final do século XIX, apenas poucas avaliações farmacológicas haviam sido efetuadas com essa espécie (MACIEL et al, 2002; CAMPOS et al. 2002; TIEPPO, 2007). Sendo que as primeiras descobertas fitoquímicas utilizando cascas do caule da *Croton cajucara* BENTH (**Figura 2**) foram realizadas através de pesquisadores da Universidade Federal do Pará. A partir de então esta planta vem sendo analisada (SIMÕES et al., 1979; TIEPPO, 2007).

**Figura 2.** Cascas do caule do *Croton cajucara* BENTH



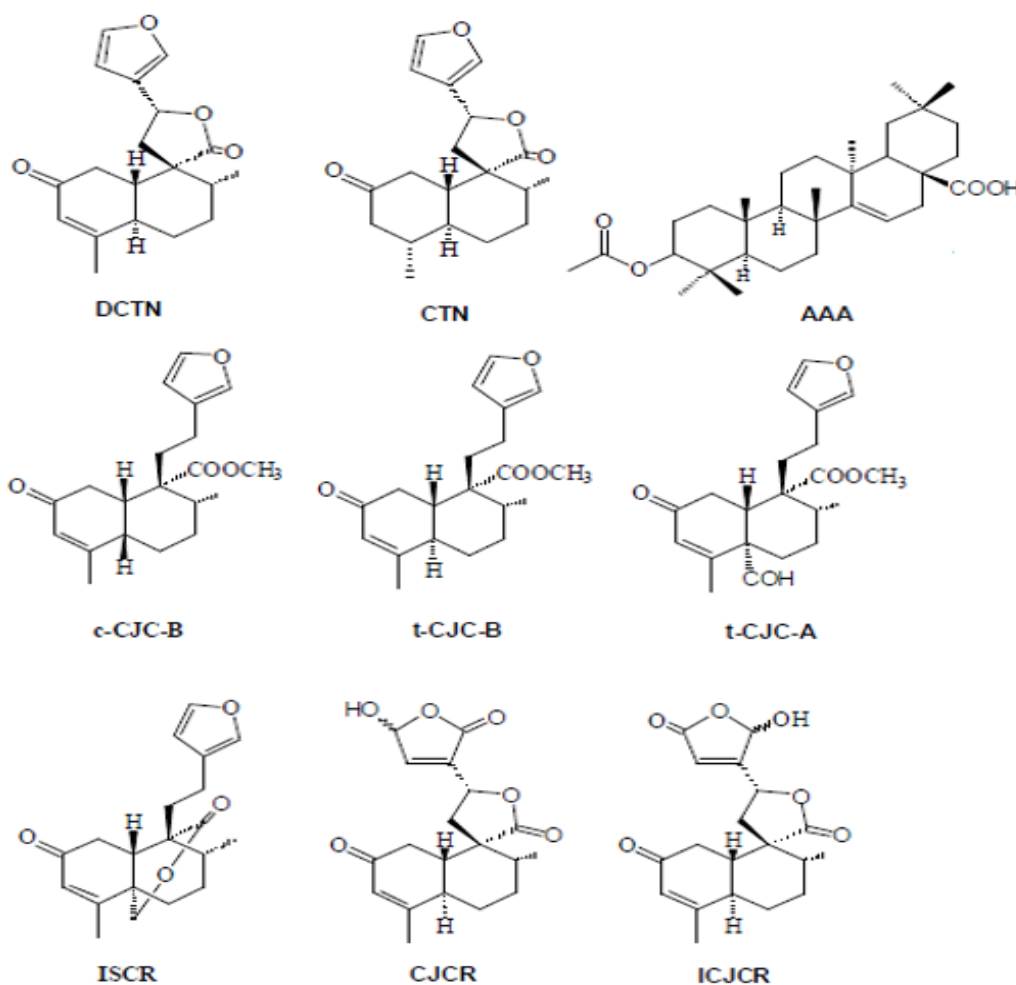
**Fonte.** MIOTTO, 2001.

Estudos farmacológicos utilizando princípios bioativos, tal como extratos das cascas do caule da *Croton cajucara* BENTH mostraram resultados de ações antiinflamatória e antinociceptiva (efeitos relacionados com indicações da planta para o tratamento de inflamações em geral), efeito hipoglicemiante (para o tratamento de diabetes); atividade antiespasmódica (tratamento da diarreia); atividade antiulcerogênica (tratamento de problemas estomacais como azia, gastrite, úlcera gástrica). Nesta espécie ainda foram evidenciadas propriedades biológicas não mencionadas pelos usuários da planta, tais como: atividade antitumoral, antiestrogênica e citotóxica (COSTA et al., 2007; MACIEL et al., 2007a; 2007b; 2006a; 2002b; 2000; 1998a; VEIGA JR et al., 2005; GRYNBERG et al., 1999; LUNACOSTA et al., 1999; CARVALHO et al., 2007; LEAL, 2008).

Estudos realizados com folhas e cascas do caule do *Croton cajucara*, que objetivaram o isolamento de substâncias majoritárias que, posteriormente, pudessem apresentar representatividade em testes biológicos, detectaram que as cascas deste vegetal são ricas em

diterpenos (do tipo clerodano), nos quais foram isolados: *trans*-desidrocrotonina (DCTN), *trans*-crotonina (CTN), *cis*-cajucarina B (c-CJC-B), *trans*-cajucarina B (t-CJC-B), cajucarina A (CJC-A), cajucarinolida (CJCR), iso-cajucarinolida (ICJCR), isosacacarina (ISCR) e o triterpeno ácido acetilaleuritólico (AAA) (**Figura 3**) (MACIEL et al., 2007a; 2006a; 2006b; 2003; 2002b; 2000; 1998a; 1998b; BARRETO et al., 2005; ICHIHARA et al., 1992; KUBO et al., 1991; ITOKAWA et al., 1989; 1989; SIMÕES 1979; LEAL, 2008).

**Figura 3.** Estruturas isoladas da casca do caule do *Croton cajucara* BENTH



Fonte. TIVERON, 2010.

### 3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas no meio ambiente. Cerca de 8.000 compostos fenólicos, em plantas, já foram catalogados. Esse vasto grupo está incluso em uma variedade de vegetais, frutas e produtos industrializados. São estruturas que

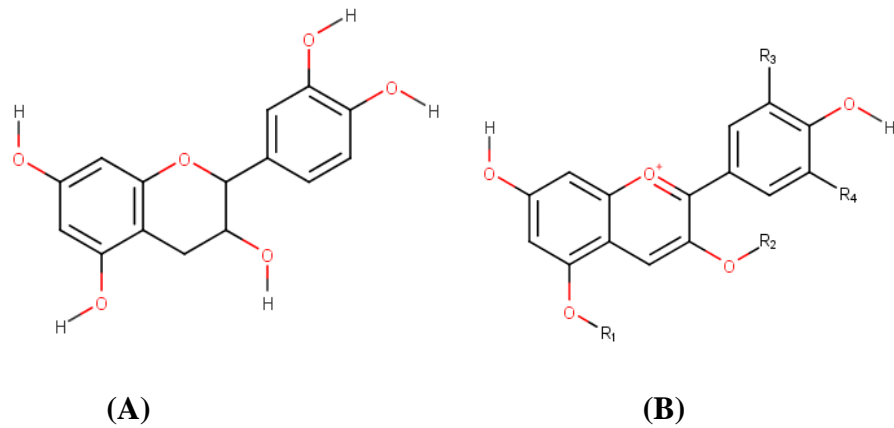
atuam como antioxidantes, seja pela sua habilidade em doar elétrons ou hidrogênio, seja por seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de lipídios. São estruturas que podem ser produtos do metabolismo secundário (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER & BERSET, 1995).

Através de contínuas transformações bioquímicas, metabólitos secundários como terpenoides, carotenoides, ácidos fenólicos, flavonoides, fitoesteróide alcaloides são sintetizados em diferentes vias metabólicas. Em plantas, os metabólitos secundários protegem os mesmos de predadores e radiação ultravioleta e regulam o crescimento e atrativos para agentes polinizadores (HERRMANN, WILLENS & JANKE, 2001; RON, WILLS & MORGAN, 2000; SIMÕES et al., 2000).

Em suas estruturas, compostos fenólicos apresentam, diversos grupos benzênicos característicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas (HERNÁNDEZ; COOPER-PATRICK et al., 1999). Esta classe de compostos é dividida em flavonoides (polifenóis) e não-flavonoides (fenóis simples ou ácidos). A alta atividade antioxidante desses compostos é garantida por estruturas como hidrogênio dos grupos hidroxila adjacentes (orto-difenóis), localizados em várias posições dos anéis A, B e C, as ligações duplas dos anéis benzênicos e a ligação dupla da função oxo ( $-C=O$ ) de algumas moléculas de flavonoides (HRAZDINA, BORZEL & ROBINSON, 1970; RICE-EVANS, MILLER & PAGANGA, 1996; LORDÉLO, 2010).

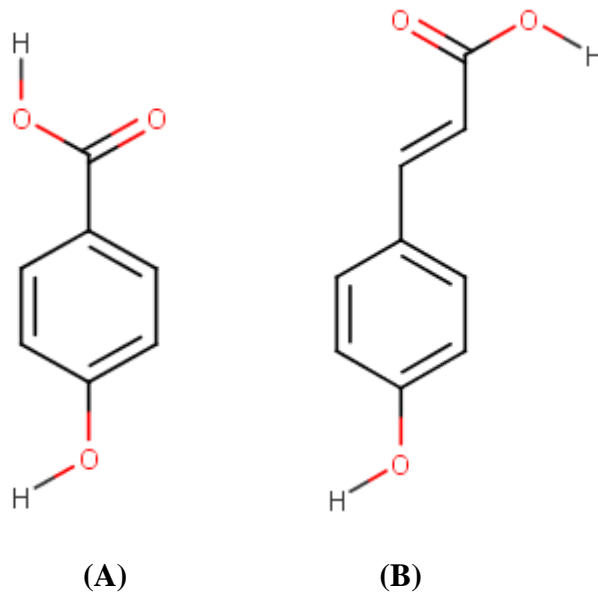
Grupos de compostos fenólicos amplamente distribuídos nos vegetais são os flavonoides, os quais apresentam muitas variações tais como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas (**Figura 4A, p. 23**), antocianinas (**Figura 4B, p. 23**), isoflavonas e chalconas. Podem ser encontrados em bebidas como, cerveja, vinho tinto e chá e em alimentos como café e cebola (VAN ACKER et al., 1996; LORDÉLO, 2010).

**Figura 4.** Exemplos de flavonoides comumente encontrados.



**Legenda=** (A) catequinas e (B) antocianinas.

**Figura 5.** Algumas estruturas do tipo não-flavonoides.



**Legenda=** (A) ácidos hidroxilbenzóico e do (B) hidroxicinâmico.

Dentro dos não-flavonoides, podemos encontrar derivados dos ácidos hidroxilbenzóico (**Figura 5A**) e hidroxicinâmico (**Figura 5B**). A posição dos grupos hidroxilas e também com a proximidade do grupo  $-\text{CO}_2\text{H}$  em relação ao grupo fenil garantem a atividade antioxidante dos não-flavonoides (HRAZDINA, BORZEL & ROBINSON, 1970; LORDÊLO, 2010).

Como mostrado anteriormente, uma das principais características dos compostos fenólicos é a sua capacidade antioxidante. Além disso, estudos mostram que sua atividade antimicrobiana e antifúngica é elevada (ALMAJANO, 2008). Segundo Wen et al. (2003), os

ácidos hidroxicinâmicos (não-flavonoide) apresentam um efeito bacteriostático frente a pHs elevados.

### 3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH)

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; (**Figura 6 A e B, p. 25**) ou ABTS [sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis/(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)] (HOTTA et al. 2001; BLASCO et al. 2004; MORIMITSU; OKAZAKI, 2009).

O sequestro do radical livre DPPH foi um método sugerido inicialmente na metade do século XIX, com o intuito de descobrir doadores de hidrogênio em produtos naturais, e, posteriormente para determinar o potencial antioxidante em fenólicos individuais e alimentos (ROGINSKY & LISSI, 2005). É um dos métodos mais utilizados para verificação da atividade antioxidante (TIVERON, 2010).

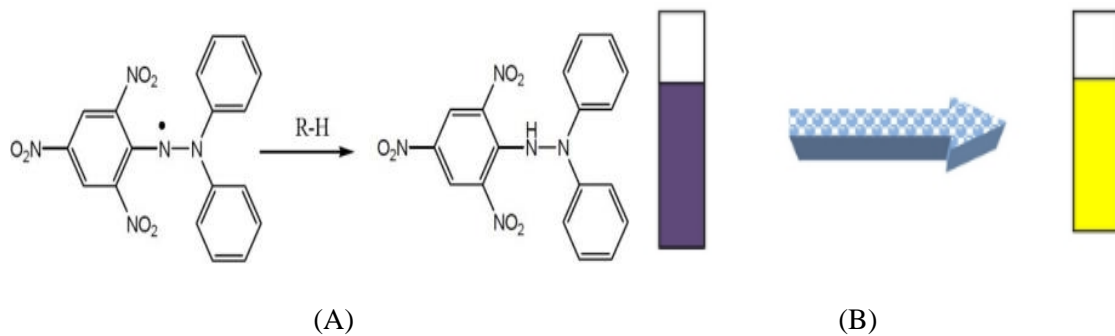
Esta técnica consiste em dispor da capacidade de captura do DPPH pelos compostos antioxidantes, sendo que o 2,2-difenil-1-picrilhidrazina fornece um máximo de absorvância à um comprimento de onda de 515 nm. Após a adição do antioxidante, produz-se uma diminuição da absorvância, proporcional à concentração e à atividade antioxidante da amostra (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

É necessário ressaltar que existem dois parâmetros os quais apresentam muitas variações quando aplicadas: a concentração inicial de DPPH e o tempo de reação. A concentração inicial pode variar de 0,025 g/L a 0,415 g/L. Já o tempo de reação pode ser fixo de 30 minutos ou o tempo que leva para alcançar o estado de equilíbrio. Na literatura, observam-se, entretanto, características comuns: o emprego de solventes (metanol, etanol) e o monitoramento da cinética da reação. (TIVERON, 2010).

Este método é empregado para analisar o mecanismo de reação de compostos polifenólicos com radicais livres (SAWAI & HILLIS, 1959). Alguns compostos reagem rapidamente com o DPPH, reduzindo um número de moléculas igual ao número de grupos OH disponíveis, formando as correspondentes oquinonas (BONDET et al., 1997).

Segundo Tiveron (2010), uma vantagem deste método é que o radical livre é estável e está disponível comercialmente, o que evita sua geração por distintas formas além de facilitar seu uso.

**Figura 6.** Processo Antioxidativo. (A) reação para capturar o DPPH e (B) alteração de coloração.



Fonte. OLIVEIRA, 2015.

### 3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Pesquisas com vegetais têm comprovado seu potencial antimicrobiano no tratamento de diversas patogenias. Com isso, há uma enorme busca pela recuperação de pesquisas sobre a atividade antimicrobiana, mecanismo de ação e potenciais de usos destas espécies (LIMA et al., 2006).

Os antimicrobianos adquiridos através do uso de plantas medicinais têm sido uma excelente alternativa para o tratamento de patogenias devido aos seus altos potenciais terapêuticos e uma ótima via para países em desenvolvimento, haja vista que estes apresentam uma vasta biodiversidade a ser explorada, como é o caso do Brasil (CALIXTO, 2005). Ademais, o uso desses vegetais é mais vantajoso que os antimicrobianos sintéticos, uma vez que os efeitos colaterais são diminutos (BELLA CRUZ et al., 2010). Como principais responsáveis pela atividade antimicrobiana de plantas medicinais têm-se alcaloides, flavonoides, taninos, terpenos e saponinas (SOUZA et al., 2007).

De modo geral, microrganismos apresentam habilidades genéticas de adquirir e difundir resistência a fármacos utilizados como agentes terapêuticos. É de suma importância ressaltar que o número de casos envolvendo microrganismos resistentes está crescendo muito e a perspectiva para o uso de antibióticos é indefinida. Portanto, é fundamental o estímulo no intuito de criar novas drogas vegetais ou adaptar as já existentes para que voltem a ter atividade antimicrobiana (COUTINHO et al., 2004).

Crê-se que diversos óleos essenciais apresentam um efeito antimicrobiano através de modificações na estrutura da parede celular do microrganismo. Altera a permeabilidade de membrana citoplasmática pela modificação no gradiente de íons hidrogênio (H<sup>+</sup>) e potássio

(K<sup>+</sup>), resultando na 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 realizada utilizando métodos como diluição para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e/ou de difusão em disco para determinar a susceptibilidade antimicrobiana (ALVES et al. 2008), sendo que alguns fatores como pH, a composição do meio, a estabilidade do composto, a concentração do inoculo e a atividade metabólica dos microrganismos afetam os métodos *in vitro* para a determinação de atividade antimicrobiana (BROOKS, G. F., BUTEL, J. S. & MORSE, S. A., 2000).

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).

A parede celular desses microrganismos é constituída principalmente de peptideoglicano, um polímero misto de açúcares e aminoácidos. Quando se fala de bactérias Gram-positivas, este polímero apresenta uma camada espessa (20-80 nm) externa a membrana celular e pode conter outras moléculas. Já as Gram-negativas, a camada peptideoglicana é delgada (5-10 nm) e superposta por uma membrana externa, ancorada a moléculas lipoproteicas no peptideoglicano (TRABULSI et al., 1999).

Destarte, o presente estudo busca analisar as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), as Gram-negativas (*Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi*) e o fungo *Candida albicans*, frente aos extratos da planta medicinal *Croton cajucara* BENTH.

▪ *Staphylococcus aureus* é conhecido como um importante patógeno humano há vários anos (KLUITMANS e WERTHEIM, 2005). Microrganismo de caráter versátil, *S. aureus* é responsável por diversas doenças, incluindo pneumonia, osteomielite, bacteremia, infecções da pele, de feridas, do sistema nervoso central, do trato urinário e infecções associadas com dispositivos intravasculares, septicemia, endocardite dentre outras. (CROSSLEY et al., 1997; FEIL et al., 2003; FEY et al., 2003; GORDON e LOWY, 2008). Esta bactéria tem despertado a atenção das indústrias alimentícias pela resistência a altas temperaturas, a desinfetantes e a soluções antissépticas, além de apresentar elevada capacidade em desenvolver resistência a diversos antibióticos ativos contra bactérias Gram-positivas (FORSYTHE, 2002).

▪ *Proteus mirabilis* são facilmente encontrados na microbiota intestinal do homem e de animais, solo e água poluída. É uma bactéria Gram-negativa, o qual os movimentos de seus flagelos apresentam uma aparência de “véu”. São considerados patógenos oportunistas.

Camundongos em experimentação, imunocomprometidos ou imunossuprimidos, são altamente suscetíveis a esses agentes. No homem, causa infecção no trato urinário. (O'HARA, C. M., BRENNER, F. W. & MILLER, J. M., 2000; STAHL, M. L. & WILLIAMS, F. D., 1981; COKER, C., 2000; MARONPOT, R. R. & PETERSON, L. G., 1981).

▪ *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria ubiqüitária o qual faz parte da microbiologia humana. Em ambientes hospitalares, torna-se um agente infeccioso importante, principalmente em pacientes predispostos, que apresentam quebra de barreiras físicas e imunossupressão. Ademais, o número de fatores de virulência é significativamente maior em cepas provindas de isolados clínicos, quando comparados às cepas do meio ambiente. Equipamentos e materiais hospitalares, principalmente com componentes líquidos, podem servir de reservatório para a *P. aeruginosa* se desenvolver, incluindo equipamentos de ventilação assistida e fluídos de administração intravenosa. (SONG, W.; WOO, H. J.; KIM, J. S.; LEE, K. M., 2003; SWADDIWUDHIPONG, W.; TANGKITCHOT, T.; SILARUG, N., 1995; PAVIANI, E. R; STADNIK, C. B.; HEINEK, I., 2004).

▪ *Salmonella typhi* apresenta uma ampla variedade e espécies (mais de 2.300 variedades sorológicas). Esta bactéria pode transmitir patogenias, como gastroenterite, infecção intestinal do endotélio vascular e febre tifoide. Sendo que estas infecções variam de acordo com o tipo sorológico da bactéria, idade e estado imunológico do hospedeiro. (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SCHAECHTER et al. 2002).

▪ *Candida albicans* é definida como levedura que frequentemente está envolvida na etiologia de infecções. Candidíase é caracterizada como a infecção fúngica mais comum, sendo seu agente etiológico mais frequente a *C. albicans*. Podemos encontrar outras espécies nos quais estão incluídas no gênero *Candida*, como *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, onde também podem transmitir a 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 Obtenção do material botânico

Neste estudo foram coletados cascas do caule de *Croton cajucara* BENTH na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), cidade de Belém, no estado do Pará, com coordenadas 1°27'15.5"S 48°26'22.0"W, utilizando o aplicativo Google Maps. A coleta foi realizada no período matutino, no décimo terceiro dia do mês de Setembro de 2016 (**Figura 7**).

**Figura 7.** Material coletado



As cascas do caule do vegetal foram devidamente secas em estufas com ar circulante à temperatura de 30°C por 72h, para remoção prévia de umidade. Após isso, os materiais foram submetidos a processos de trituração utilizando o moinho de facas e, posteriormente, moinho de bolas, a fim de se obter as granulometrias ideais para a extração. Após isso, realizou-se a análise granulométrica obtendo material do tipo pó fino e moderadamente grosso nos quais foram destinados ao planejamento experimental utilizando extração do tipo sólido-líquido em um extrator de aço-inox. A casca do caule do *Croton cajucara* BENTH (**Figura 8, p. 29**) foi pesada obtendo uma massa total de um quilo e cem gramas (1,1 Kg), deste material foram pesadas oito amostras de cem gramas (100 g), cada uma, sendo quatro amostras do material dito pó fino e quatro do pó moderadamente grosso.

**Figura 8.** Casca do caule do *Croton cajucara* BENTH



#### **4.1.2 Solventes e reagentes**

Para as extrações utilizou-se álcool etílico P.A. (marca NEON), para quantificação de compostos fenólicos, foi empregado Folin Ciocateu e metanol HPLC (marca TEDIA) para análise da atividade antioxidante.

### **4.2 MÉTODOS**

#### **4.2.1 Determinação da Umidade residual**

O teor de umidade pode ser determinado através de três métodos distintos, sendo eles: o gravimétrico, o azeotrópico e o de Karl Fischer (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; RODRIGUES, 2017).

Foi empregado neste estudo o método gravimétrico com balança por infravermelho, no qual consiste em colocar uma porção da amostra a ser analisada no coletor de alumínio que está contido dentro do aparelho, acionar o mesmo e anotar o valor, em percentual, da umidade que aparecerá no aparelho, após alguns minutos de funcionamento. (RODRIGUES, 2017).

A leitura foi realizada em um analisador de umidade por infravermelho (modelo IV 2500, marca Gehaka).

#### **4.2.2 Análise Granulométrica**

Peneiras da série Tyler (W.S. Tyler, USA) foram selecionadas e pesadas para a realização do estudo em questão. Para a análise empregou-se uma massa total de 1.076,6g. Após isso, o equipamento foi ligado, depois de 15 min, sob agitação *Rot-Up*, as peneiras

foram pesadas novamente para a determinação da quantidade de amostra retida em cada peneira. As massas obtidas foram acondicionadas em sacos plásticos.

#### 4.2.3 Caracterização do material botânico

O material botânico foi identificado através da exsicata, realizada na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), campus Belém, pelos especialistas do laboratório de botânica-herbário, Manoel Nascimento, Eduardo Nascimento e Silvana Tavares. A exsicata de código 01, foi preparada para sua identificação (**Figura 9, p. 30**), acompanhada de um cartão de identificação contendo dados da espécie em questão e de sua coleta.

**Figura 9.** Exsicata preparada para identificação de sua espécie



#### 4.2.4 Planejamento Experimental de Extração

##### 4.2.4.1 Extração Convencional

Para o processo de extração da casca do vegetal *C. cajucara* BENTH foi utilizado como solvente o etanol. As variáveis empregadas foram temperatura e granulometria, sendo estas estabelecidas pelo planejamento Box Hunter e Hunter, modelo constituído em dois níveis (+1,-1). Uma vez que “K” é proporcional ao número de variáveis envolvidas, obteve-se um total de 4 corridas experimentais, além da adição de mais uma replicata, totalizando 8 corridas.

A temperatura empregada foi em graus Celsius e a granulometria em mm, como variáveis de entrada. Estas foram representadas por  $X_1$  e  $X_2$ , respectivamente, como mostra a **Tabela 2, p. 31**.

**Tabela 2.** Variáveis de entrada e seus níveis

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

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

Em relação aos fatores fixos temos: a agitação (500 rpm), massa do material botânico (100 g), relação massa solvente (1:6) e tempo de extração (120 min).

Para as variáveis de entrada, o rendimento percentual do extrato obtido, quantificação de compostos fenólicos, avaliação da atividade antioxidante e avaliação da atividade antimicrobiana foram avaliados como análise de resposta.

Os testes experimentais foram dispostos de forma aleatória, como é fornecido pela matriz de planejamento (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Matriz de experimentos com parâmetros variáveis

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

**Legenda:** X<sub>1</sub>= temperatura; X<sub>2</sub>= granulometria.

#### 4.2.4.2 Operação do equipamento

Para o processo de extração convencional, utilizou-se em escala laboratorial, um extrator encamisado, feito de aço inoxidável, com agitador mecânico, marca QUIMIS, acoplado a um banho termostático de circulação de fluido, marca HAAKE. A parte superior do extrator dispõe de 3 orifícios, os quais são utilizados um para introdução do agitador mecânico, um para o termômetro e outro era fechado com um bico de vidro (**Figura 10**). Periodicamente, media-se a temperatura interna do reator. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Catálise e Biocatálise (LABCAT) localizado no laboratório de Engenharia Química da Universidade Federal do Pará.

O agitador era fixo no centro do reator para não se obter falhas rotacionais no decorrer da análise. Sempre que se observava vibrações na lateral do reator, ajustava-se o mesmo de certa forma a minimizar estas vibrações.

O agitador mecânico empregado para a realização deste estudo possui capacidade de até 1000 rpm, no qual está fixo no suporte do reator; já a hélice do agitador apresenta 3 pás (tipo marinha).

A extração é uma operação cujo objetivo é separar uma substância, seja ela sólida ou líquida, através de um solvente (MARAMBIO, 2007). Portanto, esta é uma técnica empregada para separar e purificar (com auxílio de processo de destilação) compostos de substâncias indesejadas.

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

**Figura 10.** Sistema para extração.



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

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

É de extrema importância salientar que o banho termostático é conectado ao extrator para que haja um débil e suave fluxo de circulação interna do fluido. Ademais o sistema é devidamente ligado, quando a temperatura (definida pela matriz de planejamento) é atingida, sendo controlada pelo sistema de resfriamento/aquecimento.

Após as extrações convencionais, as amostras foram levadas ao evaporador rotativo (extração a vácuo), marca TECNAL, modelo TE-211, como é ilustrado pela **Figura 11**. Este teve a função de retirar o máximo de solvente ainda existente nas amostras. Para isso, utilizou-se a temperatura de aproximadamente 60°C no evaporador rotativo. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais (LEPRON) localizado no laboratório de Engenharia Química da Universidade Federal do Pará.

**Figura 11.** Evaporador rotativo em funcionamento



Após isso, os extratos foram levados à capela do Laboratório de Extração, também localizado no laboratório de Engenharia Química da UFPA, no qual permaneceram lá, até as amostras obterem massa constante.

Periodicamente, as amostras eram pesadas na balança analítica (BEL Engineering, modelo M214A) do Laboratório de Corantes, também localizado no laboratório de Engenharia Química da Universidade Federal do Pará e foram armazenados em recipientes de vidro.

#### 4.2.5 Cálculo do rendimento dos extratos (%)

Para obtermos o rendimento da extração do extrato à base de álcool etílico utilizando as cascas do caule do *C. cajucara* BENTH, em base seca, foi necessário aplicar a **Equação 1**.

$$Rd = \frac{M_o}{M} \quad (1)$$

Onde:

Rd: rendimento da extração (%);

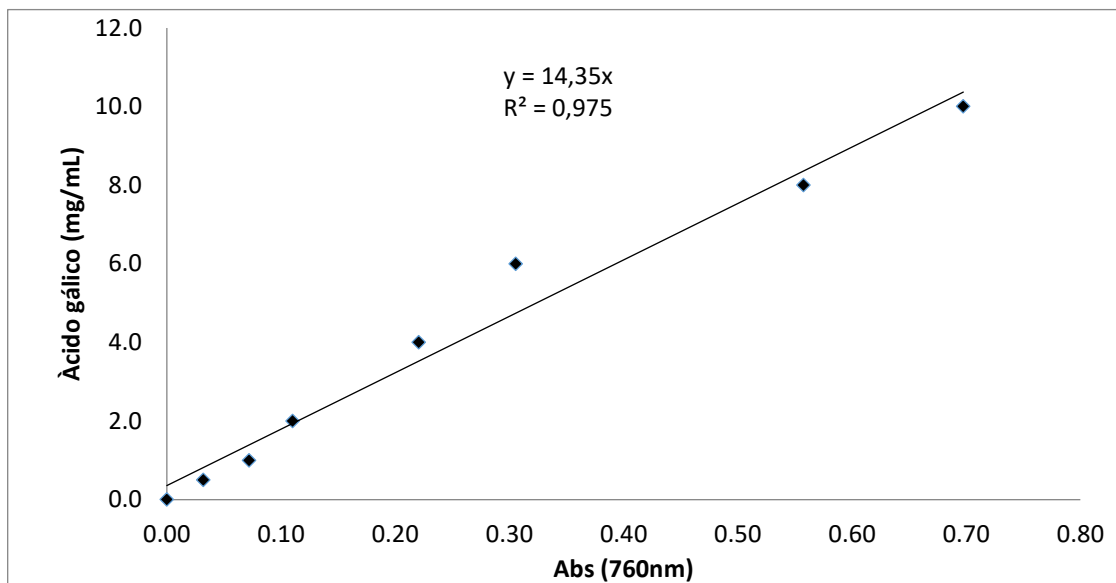
$M_o$  é a massa de extrato obtida experimentalmente (g);

$M$  é a massa da matéria-prima em base seca (g).

### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos totais dos extratos do *Croton cajucara* BENTH foram quantificados através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteau (GUTFINGER, 1981) com algumas alterações, utilizando o ácido gálico para construção da curva-padrão (**Figura 12, p. 35**). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por g de peso seco da amostra (mg EAG/g). A determinação dos compostos fenólicos empregando o reagente de Folin-Ciocalteau, 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 12.** Calibração com Ácido Gálico para o teste de quantificação de compostos fenólicos



Onde

$R^2$ : Coeficiente de determinação

Abs: Absorbância do extrato

Preparou-se uma solução mãe de cada um dos 8 ensaios com 10 mg do extrato bruto para 3 mL de álcool etílico (1:3), posteriormente tiveram seus pHs ajustados para neutro (pH=7), utilizando uma solução de carbonato de sódio ( $\text{NaCO}_3$ ). O valor de absorbância em que os ensaios devem ficar é entre 0,300 a 0,700.

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

As cubetas foram isoladas, à temperatura ambiente e após 30 min foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 760 nm (UV-Vis, QUIMIS).

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para a determinação do potencial antioxidante dos ensaios, utilizou-se o cromóforo DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (CAVIN et al., 1998; BOUCHET et al., 1998). Para a realização do experimento, foi necessário preparar uma solução de DPPH 0,06 mM momentos antes de seu uso. Preparou-se uma solução mãe de cada um dos 8 ensaios com 20 mg de extrato bruto para 1 mL de etanol. Em cubetas de leitura, transferiu-se 0,05 mL da amostra 1,95 mL de solução de DPPH 0,06 mM (**AA**). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, marca QUIMIS, a 570 nm em tempos de 0 min, 15 min, 30 min, 45 min e 60 min.

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

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

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

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

$$\% \text{inibição} = \frac{[(AA - AB)]}{AC} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

AA: absorbância da amostra;

AB: absorbância do branco;

AC: absorbância do controle negativo.

#### 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; *Salmonella spp.* ATCC 14029, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583, *Candida albicans* ATCC 1009 e *Proteus mirabilis* ATCC 7002, obtidas da FIOCRUZ/Laboratório Central do Estado do Pará (LACEN-PA).

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 *Pseudomonas aeruginosa*, Ágar McConkey para *Proteus mirabilis*, 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.

#### 4.5.1 Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura os quais foram empregados nesse estudo, foram preparados segundo as recomendações do fabricante, com UFC 10<sup>8</sup>.

1. Ágar Sabouraud Dextrose;
2. Ágar MacConkey;
3. Ágar Nutriente;
4. Ágar Manitol;
5. Ágar Müller Hinton; e
6. Caldo Müller Hinton.

#### 4.5.2 Método de microdiluição para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

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

Em 54 poços da placa com 96 poços (**Figura 13, p. 38**) adicionou-se 0,180 mL de caldo Müller Hinton, 0,010 mL das amostras (extratos da casca do *Croton cajucara BENTH*) e 0,010 mL das suspensões bacterianas, num total de 0,200 mL.

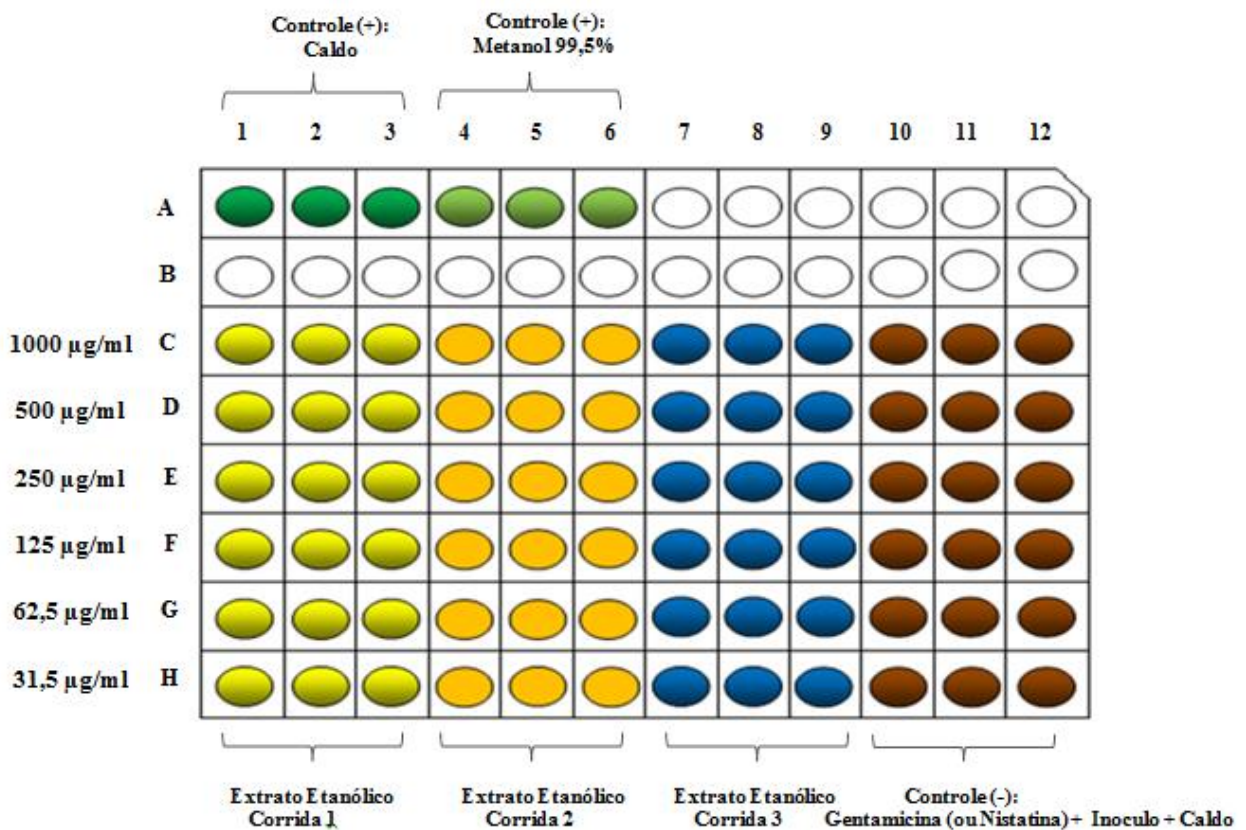
Para o controle negativo foi utilizado uma mistura contendo 0,010 mL da suspensão bacteriana + 0,010 mL de gentamicina (antibiótico para bactérias) ou nistatina (antibiótico para fungo) e 1,80 mL de caldo Müller Hinton; já para o controle positivo, em 3 poços empregou-se 0,180 mL de álcool metílico 99,5% e em outros 3 poços 0,180 mL de caldo Müller Hinton (CLSI, 2003).

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

A cor azul indica o 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 é considerada moderada; CIM entre 500 a 1000 µg/mL esta atividade é considerada fraca e a amostra é considerada inativa quando a CIM > 1000 µg/mL (HOLETZ et al., 2002).

**Figura 13.** Placa com 96 orifícios utilizada para a determinação de CIM



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS

#### 5.1.1 Determinação da Umidade do *C. cajucara*

A casca do *Croton cajucara* apresentou um valor médio de umidade final de 8,0% em base seca, valor este que está de acordo com o estudo de Brandão (2007), o qual indica que a faixa de teor de umidade para materiais botânicos é de 8 a 14 %, haja vista que uma porcentagem de umidade superior pode causar deterioração por contaminação microbiana e transformações químicas dos metabólitos secundários.

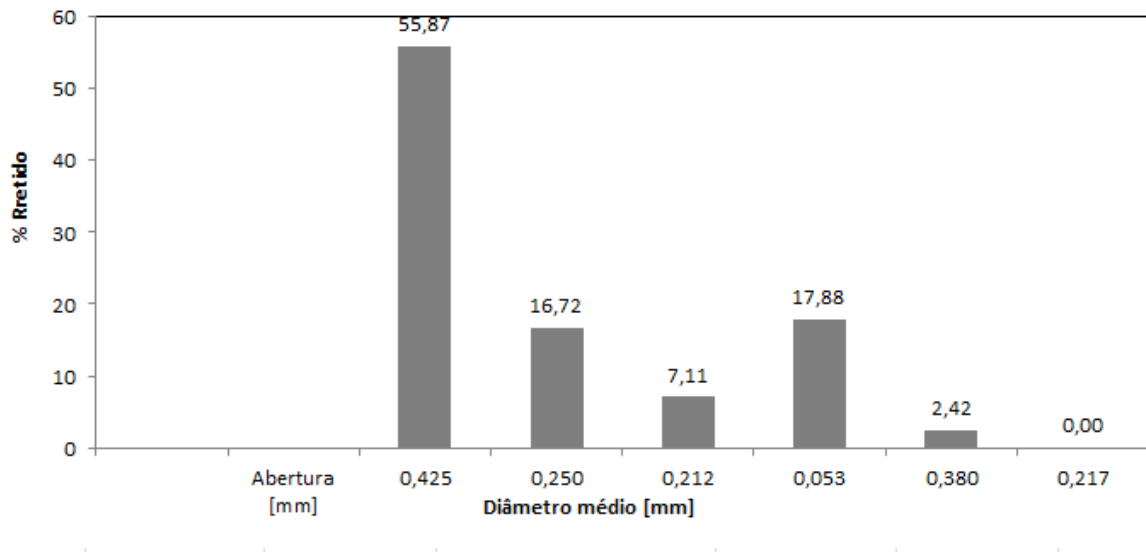
#### 5.1.2 Análise Granulométrica da Casca do *Croton cajucara* BENTH

Para a realização da análise granulométrica do material botânico, utilizou-se peneiras Tylers de 30, 60, 65, 270 e 400 mm, além de um coletor o qual determinou as faixas granulométricas. As faixas nos quais a cascas do caule do material botânico foram mais retidas 0-35 mm e 65-270 mm, apresentando respectivamente 55,87% e 17,88% (**Tabela 4 e Figura 14, p. 40**).

**Tabela 4.** Dados utilizados para os cálculos do Diâmetro médio de Sauter

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

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

**Figura 14.** Gráfico da Distribuição Granulométrica da casca do caule do *C. cajucara* BENTH

Aplicando os valores obtidos com a análise distribuição granulométrica na **Equação 3**, obteve-se um diâmetro médio de Sauter das partículas para o pó moderadamente grosso de 0,51 mm e 0,10 mm para o pó fino.

$$D_m = \sum Pr \quad (3)$$

Onde:

$D_m$  = Diâmetro médio de Sauter;

$Pr$  = Produtório obtido.

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 Análise de rendimento

Na tabela 5 pode-se observar que o maior e menor valor de rendimento (em porcentagem) das cascas do *C. cajucara* foram as do ensaio 6 e 5, respectivamente com 9.11 ( $G = 0,10$  mm e  $T = 50$  °C) e 5.15 ( $G = 0,10$  mm e  $T = 60$  °C). Já para o estudo de Damasceno (2010), que utilizou cascas do *C. palanostigma* os ensaios com menor e maior rendimento

foram, respectivamente, as dos ensaios 9 e 12 com 1,63% (m/s = 1:2 g/mL, t = 30 min e T = 40 °C) e 8,15% (m/s = 1:6 g/mL, t = 90 min e T = 40 °C).

Para o valor de rendimento máximo foi empregado uma temperatura de 60°C e granulometria fina do material botânico. Já para o menor rendimento também se utilizou a granulometria do tipo fino da amostra, entretanto, para este caso, a temperatura empregada foi de 50°C. Isso mostra que quanto maior a temperatura empregada no sistema, as partículas do material botânico se dissolvem facilmente no solvente, o que aumenta a quantidade de extrato final. Ou seja, há uma relação direta entre a solubilidade do material botânico e a temperatura.

Além das variáveis propostas neste estudo, outros fatores puderam ter influenciado na análise, tais como o tempo de armazenamento entre a coleta do material botânico e a extração e o solvente empregado.

Com um grande intervalo de tempo de armazenamento entre a coleta e a extração, o material pode absorver umidade, aumentando, assim, a atividade respiratória dos grãos, facilitando a deterioração da matéria-prima. Neste caso, este fator pôde ter diminuído os rendimentos do processo.

**Tabela 5.** Resultados da variável de resposta Rendimento

| ENSAIOS | VARIÁVEIS REAIS |             | RD (%)      |
|---------|-----------------|-------------|-------------|
|         | T (°C)          | G (mm)      |             |
| 1       | 50              | 0,10        | 5,98        |
| 2       | 60              | 0,10        | 8,99        |
| 3       | 50              | 0,51        | 5,71        |
| 4       | 60              | 0,51        | 8,96        |
| 5       | <b>50</b>       | <b>0,10</b> | <b>5,15</b> |
| 6       | <b>60</b>       | <b>0,10</b> | <b>9,11</b> |
| 7       | 50              | 0,51        | 5,34        |
| 8       | 60              | 0,51        | 7,64        |

**Legenda:** T= temperatura; G= granulometria ; RD= rendimento; mm= milímetro; %= porcentagem; °C= Graus Celsius.

O solvente também teve alta importância para a análise, influenciando positivamente na extração realizada, pois se obteve uma grande quantidade de extrato final para a quantidade de solvente empregada.

De modo geral, a extração com utilização do extrator apresentou rendimentos consideráveis. Todavia demandou um tempo elevado para cada extração, além de uma quantidade relativamente alta de solvente.

#### 5.2.1.2 Análise estatística da variável de resposta Rendimento (RD)

Na análise da variância para a variável de resposta (RD), obteve-se um valor de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9398 ou 93,98%, mostrando que o modelo proposto descreveu adequadamente a resposta em estudo.

Os resultados adquiridos dos efeitos dos parâmetros estão apresentados na **Tabela 6**, o qual nos informa que a variável isolada  $X_1(T)$  foi estatisticamente significativa para a variável de resposta Rendimento.

**Tabela 6.** Efeitos Estimados para Rendimento

| FATOR             | EFEITOS $\pm$ ERRO PADRÃO         |
|-------------------|-----------------------------------|
| Média             | 7,11 $\pm$ 0,20                   |
| $X_1$             | <b>3,13 <math>\pm</math> 0,40</b> |
| $X_2$             | -0,39 $\pm$ 0,40                  |
| ( $X_1$ x $X_2$ ) | -0,35 $\pm$ 0,40                  |

**Legenda:**  $X_1$ =Temperatura;  $X_2$ =Granulometria.

A pesquisa da ANOVA (**Tabela 7, p. 47**), para a variável de resposta Rd, foi avaliada com base no valor de “p”, o qual indica a probabilidade de cada variável de entrada possuir ou não significância para variáveis de resposta e comprovou que a variável  $X_1$  (T) apresentou efeito estatisticamente significativo em um nível de significância menor que 5% ( $p < 0,05$ ), onde ela mostra uma menor probabilidade de estar na região de hipótese nula (não apresentando significância estatística para a resposta). Porém a variável linear  $X_2$  (G) e combinada  $X_1 \times X_2$  (T x G), não apresentaram significância estatística para RD.

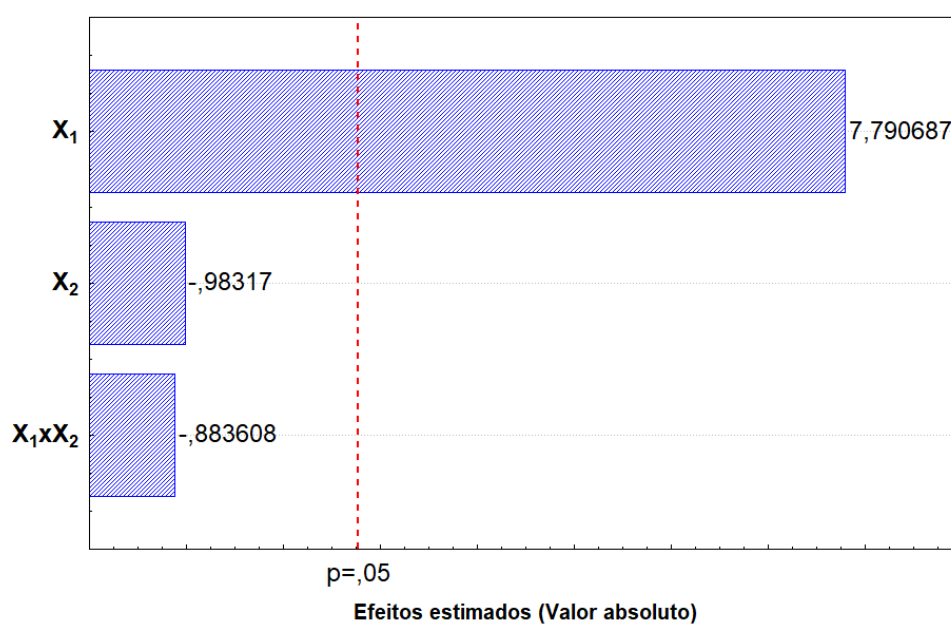
**Tabela 7.** Análise de variância (ANOVA) para a variável de resposta Rendimento

| FATOR DE VARIAÇÃO                  | SQ    | GL | MQ    | p     |
|------------------------------------|-------|----|-------|-------|
| X <sub>1</sub>                     | 19,59 | 1  | 19,59 | 0,001 |
| X <sub>2</sub>                     | 0,31  | 1  | 0,31  | 0,381 |
| (X <sub>1</sub> x X <sub>2</sub> ) | 0,25  | 1  | 0,25  | 0,427 |
| Erro Puro                          | 1,29  | 4  | 0,32  |       |
| Total SQ                           | 21,45 | 7  |       |       |

$R^2 = 0,9398$

**Legenda:** SQ= Soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; MQ= média quadrática; p: Análise de probabilidade; X<sub>1</sub>= Temperatura; X<sub>2</sub>= Granulometria.

A **Figura 15** (Gráfico de Pareto) mostra os efeitos individuais e combinados em relação à variável resposta, além disso, descreve os efeitos estimados padronizados (razão entre os efeitos estimados e o desvio padrão correspondente) que cada variável exerce na resposta. O limite de rejeição da hipótese nula ( $p = 0,05$ ) é mostrado pela linha vertical; para a avaliação da resposta (RD), em que os efeitos localizados a direita desta linha apresentam influência estatística sobre a variável de resposta. O gráfico confirma que a variável isolada X<sub>1</sub> (T) foi significativa no nível de 95% do limite de confiança uma vez que essa variável é encontrada à direita da reta do limite de rejeição da hipótese nula.

**Figura 15.** Gráfico de pareto para a resposta Rendimento

**Legenda:** X<sub>1</sub>=Temperatura; X<sub>2</sub>= Granulometria.

Com base na variável influente para os valores de RD, o qual foi observado no tratamento estatístico feito acima, foi proposto um modelo matemático de 1ª ordem que é mostrado na **Equação 4**.

$$Rd = \beta_0 + \beta_1 X_1 \quad (4)$$

Substituindo os valores dos coeficientes de regressão (**Tabela 8**), obtêm-se a Equação 5.

**Tabela 8.** Coeficientes de regressão para a variável de resposta Rendimento

| PARÂMETROS | COEICIENTES |
|------------|-------------|
| Média      | 7,11        |
| $X_1$      | 1,57        |

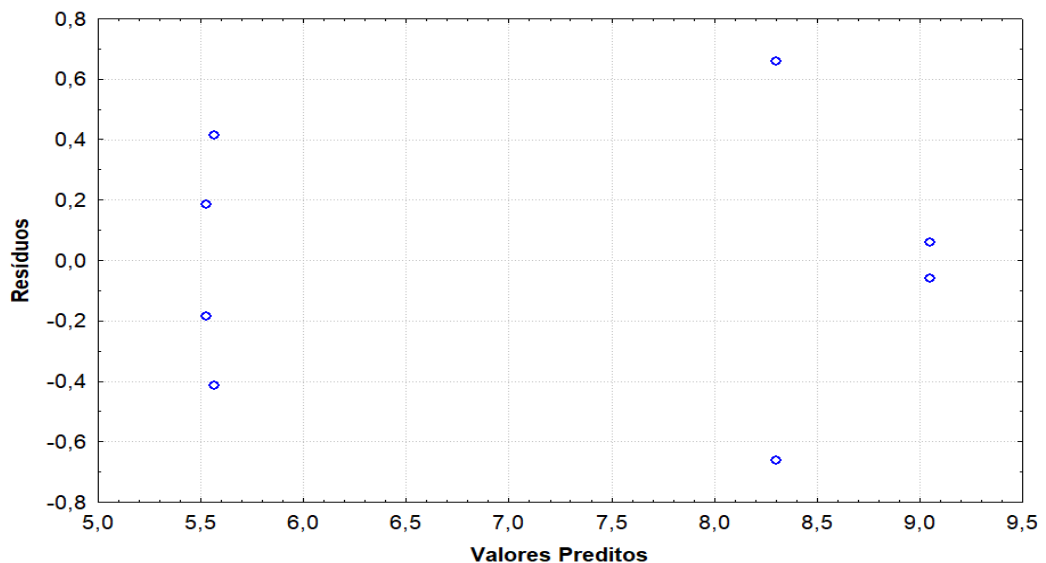
**Legenda:**  $X_1$  = Temperatura.

$$Rd = 7,11 + 1,57X_1 \quad (5)$$

O polinômio matemático de 1ª ordem (Equação 4), representa bem os dados experimentais estudados, uma vez que  $R^2 = 0,9398$  (**Tabela 7, p. 43**) o qual mostra a proporção de variabilidade em torno da média.

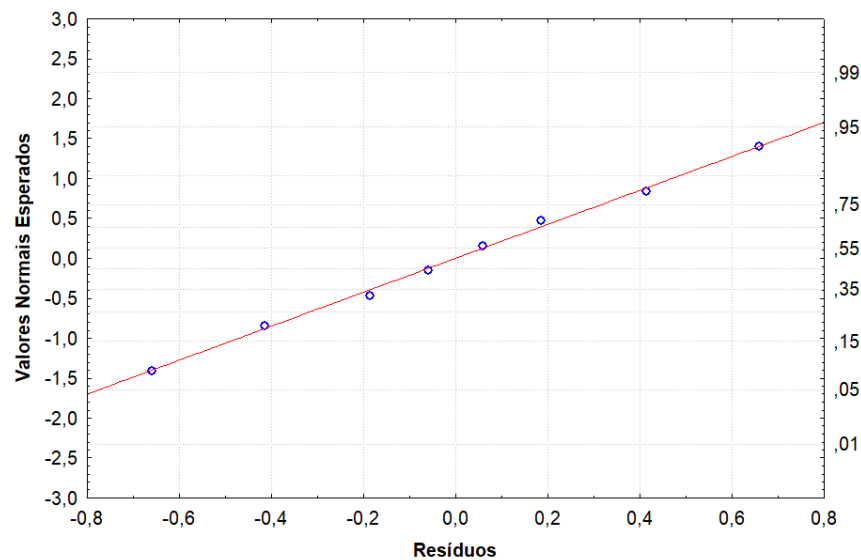
A análise de resíduos avalia a amplitude dos resíduos em torno do zero, bem como representa a distribuição de resíduos em função dos valores preditos pelo modelo proposto, ou seja, esta análise designa que a distribuição dos resíduos tem de ser aleatória, não apresentando comportamento sistemático ou tendencioso (**Figura 16**).

**Figura 16.** Gráfico da Distribuição dos resíduos para o Rendimento



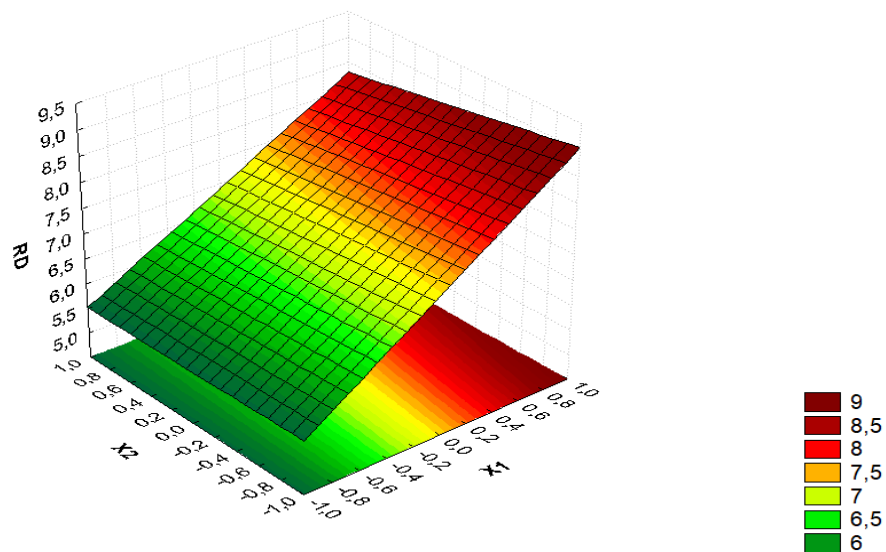
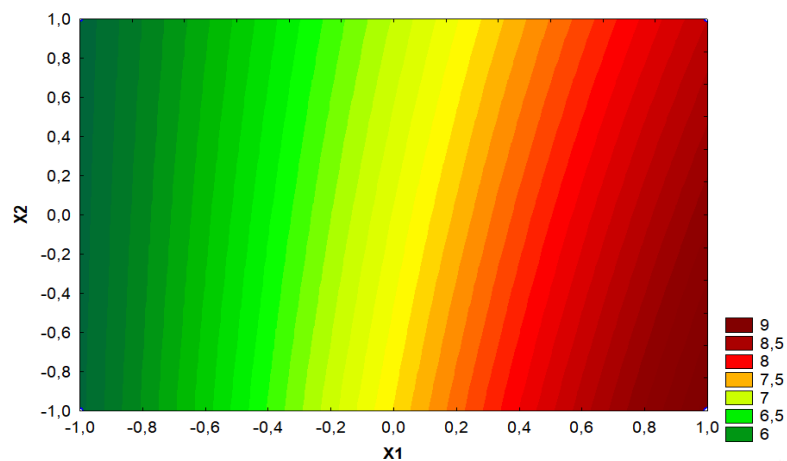
A distribuição de probabilidade normal dos resíduos é uma distribuição onde os pontos terão de estar devidamente centralizados ou muito próximos da reta que intercepta o gráfico. Na **Figura 17** verifica-se que o modelo proposto gerou resíduos baixos que vão de -0,8 a 0,8 e é possível comprovar que a análise está de forma coerente com a hipótese estatística, o qual deve ser obedecido para que modelo de regressão apresente precisão nos valores de RD. No gráfico de normalidade é possível verificar que os pontos experimentais estão dentro da curva, que está representada pela linha vermelha.

**Figura 17.** Gráfico do Teste de Normalidade para Rendimento



A análise de superfície de resposta foi aplicada para investigar qual a combinação de variáveis de entrada que teve influência significativa para obtenção de maiores rendimentos. O gráfico de superfície de resposta mostra que o eixo z mostra a resposta RD e nos eixos x e y as variáveis utilizadas no estudo.

Nas **Figuras 18, p. 46 e 19, p. 46** é possível observar que as condições que favorecem altos rendimentos são  $X_1$  (temperatura) no seu nível máximo +1 e  $X_2$  (granulometria) no seu valor mínimo -1, em outras palavras,  $T = 60^\circ\text{C}$  e  $G = 0,10$  mm.

**Figura 18.** Gráfico da Superfície de Resposta para o Rendimento**Figura 19.** Curva de Nível para Rendimento

### 5.2.2 Quantificação de Compostos Fenólicos

A **Tabela 9**, p. 47 contém os valores da quantificação dos compostos fenólicos totais dos extratos. Os valores foram calculados a partir da equação de regressão  $y = 14,35x$ , com coeficiente de correlação ( $R^2$ ) igual a 0,975, o qual foi obtido pela curva de calibração do ácido gálico ( $y$  é a absorbância a 750 nm e  $x$  é a concentração em mg de ácido gálico em g de extrato).

Os valores máximos e mínimos foram os dos ensaios 4 ( $T = 60\text{ }^\circ\text{C}$  e  $G = 0,51\text{ mm}$ ) e 6 ( $T = 60\text{ }^\circ\text{C}$  e  $G = 0,10\text{ mm}$ ), os quais forneceram 50,32 e 26,98 mg EAG/g de amostra, respectivamente. A concentração elevada nos extratos nos mostra que a biossíntese dos

compostos bioativos é acelerada pela exposição aos raios ultravioleta e promovem a proteção da planta contra esses raios emitidos pelo sol (HARBONE e WILLIAMS, 2000).

O método é bastante utilizado para quantificar compostos de óleos essenciais e extratos derivados de matéria-prima vegetal, haja vista que os metabólitos secundários contidos nos materiais botânicos são uma classe no qual apresentam maior habilidade em ceder elétrons para outras estruturas, logo, são associadas à capacidade antioxidante que estas espécies podem apresentar (RODRIGUES, 2017).

**Tabela 9.** Resultados da variável de resposta Compostos Fenólicos

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

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

Todavia a quantificação desses compostos com utilização de Folin-Ciocalteu pode sofrer influências de diversos fatores como 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, gerando resultados que superestimem a quantidade de fenóis no meio ou fornecendo resultados falso-positivos. (ANGELO; JORGE, 2007). Apesar disso, é uma metodologia espectrofotométrica muito empregada, sempre sendo revalidada para comprovar sua eficácia. (OLIVEIRA et al., 2009).

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

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

Na **Tabela 10**, é possível verificar os valores dos efeitos dos parâmetros, o qual nos fornece a informação de que as variáveis isolada  $X_2$  (G) e de combinação binária  $X_1X_2$  (T x G), apresentaram influência significativa para a resposta CF. Nesse caso,  $X_2$  e  $X_1X_2$  causaram um efeito negativo na variável de resposta.

**Tabela 10.** Efeitos estimados para Quantificação dos Compostos Fenólicos

| FATOR             | EFEITOS ± ERRO PADRÃO |
|-------------------|-----------------------|
| Média             | 38,15 ± 1,12          |
| $X_1$             | 2,45 ± 2,24           |
| $X_2$             | <b>-8,07 ± 2,24</b>   |
| ( $X_1$ x $X_2$ ) | <b>-11,99 ± 2,24</b>  |

**Legenda:**  $X_1$ =Temperatura;  $X_2$ =Granulometria.

A análise da ANOVA (**Tabela 11, p. 49**), para a variável de resposta CF confirmou que as variáveis  $X_2$  e  $X_1X_2$  apresentaram influência estatisticamente significativa em um nível de significância menor que 5% ( $p < 0,05$ ), onde mostra uma menor probabilidade de estar na região de hipótese nula (sem significância estatística para a resposta). Neste caso, a variável  $X_1$  (T), não apresentou influência estatística na variável de resposta CF.

**Tabela 11.** ANOVA para Quantificação dos Compostos Fenólicos

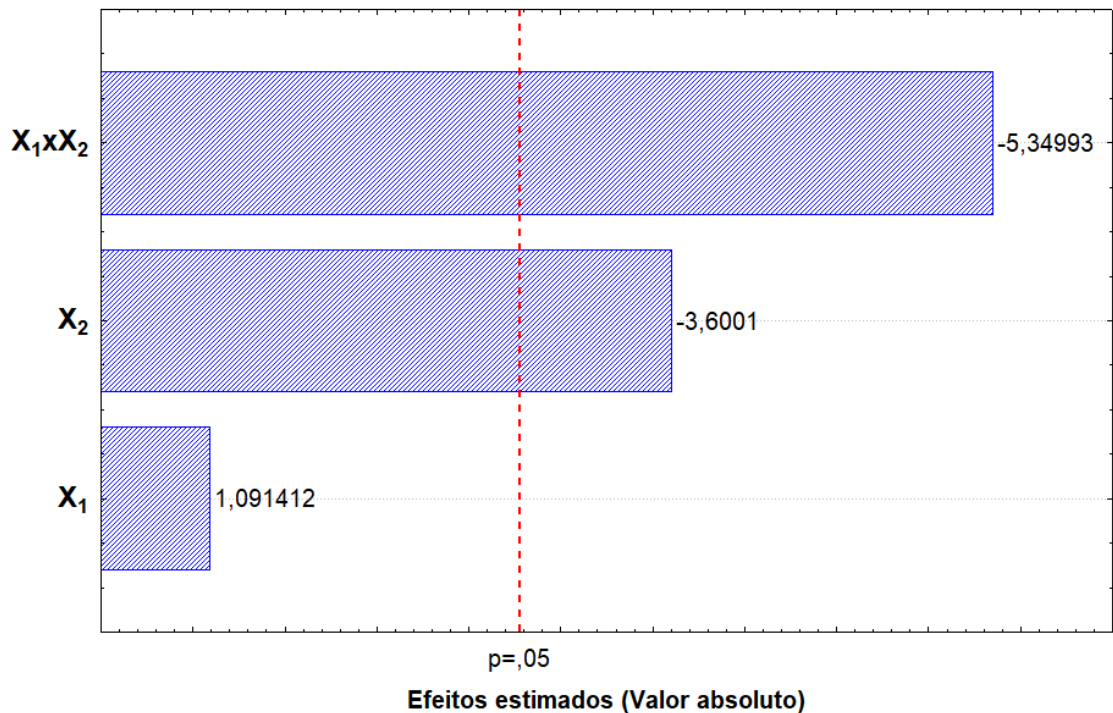
| FATOR DE VARIAÇÃO | SQ            | GL       | MQ            | p            |
|-------------------|---------------|----------|---------------|--------------|
| $X_1$             | 11,96         | 1        | 11,96         | 0,336        |
| $X_2$             | <b>130,09</b> | <b>1</b> | <b>130,09</b>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

$R^2 = 0,9145$

**Legenda:** SQ= Soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; MQ= média quadrática; p= Análise de probabilidade;  $X_1$ = Temperatura;  $X_2$ = Granulometria.

O gráfico de pareto (**Figura 20**) confirmou que as variáveis isoladas  $X_1 \times X_2$  (**T x G**) e  $X_2$  (**G**) apresentaram significância em 95% do limite de confiança, uma vez que as variáveis estão à direita da reta vertical indicativa do limite de rejeição da hipótese nula. As variáveis  $X_1 \times X_2$  e  $X_2$  apresentaram um efeito que causava uma redução na quantificação dos compostos fenólicos totais do processo extrativo.

**Figura 20.** Gráfico de pareto para a resposta Compostos Fenólicos



**Legenda:**  $X_1$ = Temperatura;  $X_2$ = Granulometria.

De acordo com as variáveis influentes para os valores de CF, que foi observado na análise estatística realizada anteriormente, propõe-se o modelo estatístico genérico de 1ª ordem está apresentado na **Equação 6**.

$$PT = \beta_0 + \beta_1 X_2 + \beta_2 X_1 X_2 \quad (6)$$

Substituindo os valores dos coeficientes de regressão (**Tabela 12**), obtêm-se a **Equação 7**.

**Tabela 12.** Coeficientes de regressão para a variável de resposta Compostos Fenólicos

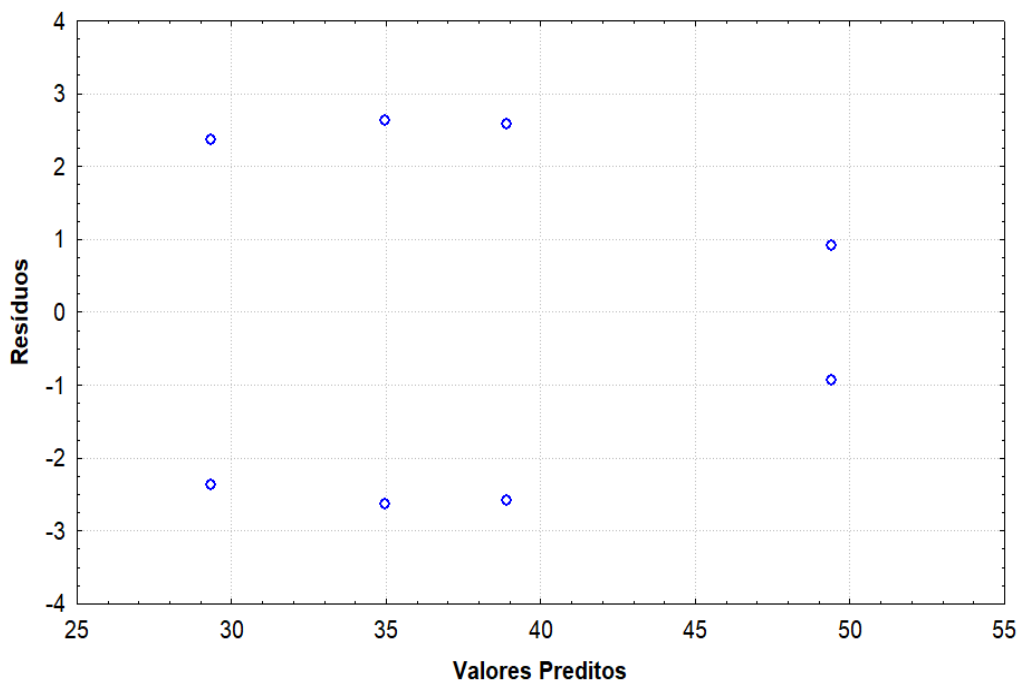
| PARÂMETROS       | COEICIENTES |
|------------------|-------------|
| Média            | 38,15       |
| $X_2$            | -4,03       |
| $X_1 \times X_2$ | -5,99       |

**Legenda:**  $X_1$ = Temperatura;  $X_1X_2$ = Temperatura e granulometria.

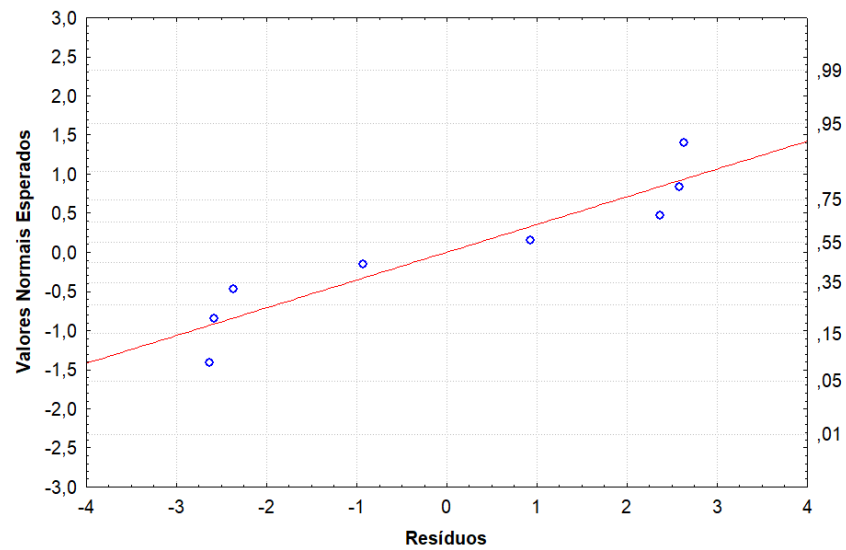
$$PT = 38,15 - 4,03X_2 - 5,99X_1X_2 \quad (7)$$

A análise que mostra a distribuição dos resíduos de forma aleatória, não apresentando comportamento sistemático ou tendencioso para a resposta Compostos Fenólicos é apresentada na **Figura 21**.

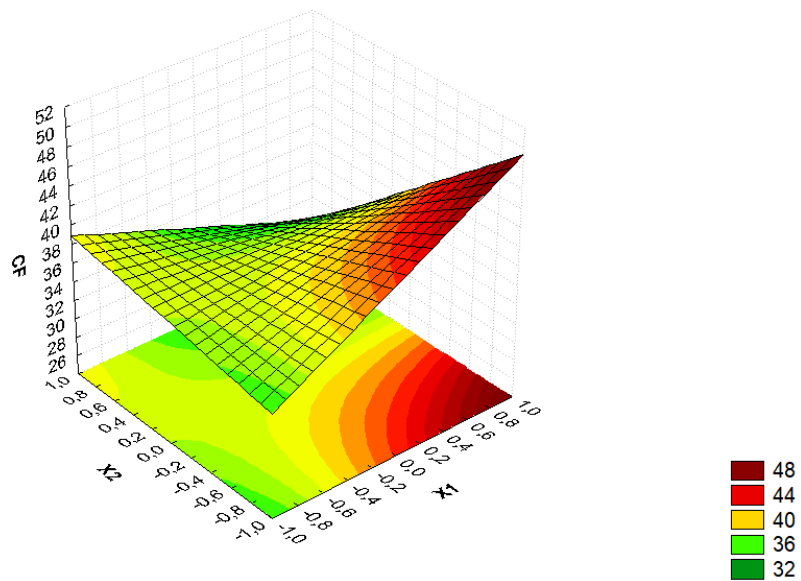
**Figura 21.** Gráfico da Distribuição dos resíduos em função dos valores preditos para os Compostos Fenólicos

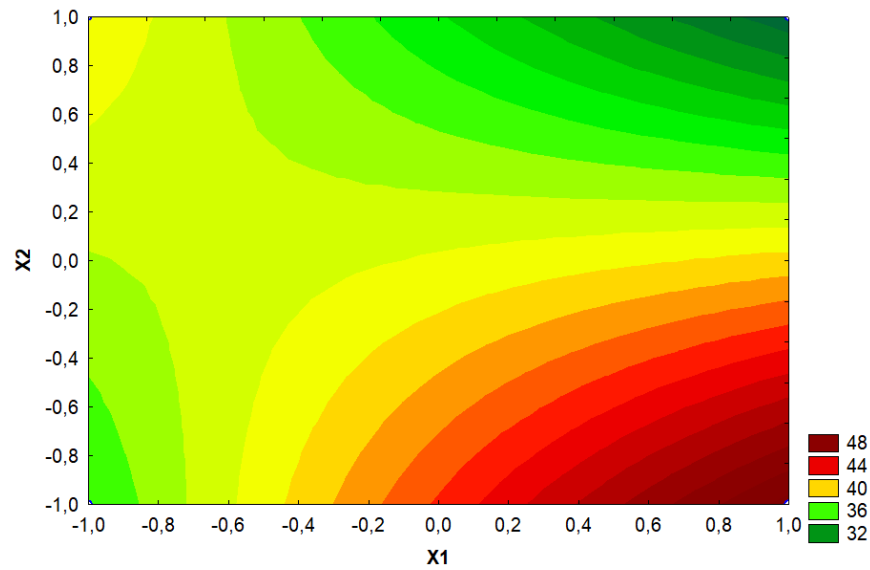


A **Figura 22** apresenta a distribuição de probabilidade normal dos resíduos, onde os pontos terão de estar devidamente muito próximos ou centralizados na reta que intercepta o gráfico. Neste caso, alguns pontos se dispersaram da reta. Verifica-se que modelo proposto gerou resíduos altos que vão de -4 a 4 e que não há tanta precisão nos valores de compostos fenólicos fornecido pelo modelo de regressão. No gráfico de normalidade é verificado que os pontos experimentais estão dentro da curva, que está representada pela linha vermelha.

**Figura 22.** Gráfico do Teste de Normalidade para Compostos Fenólicos

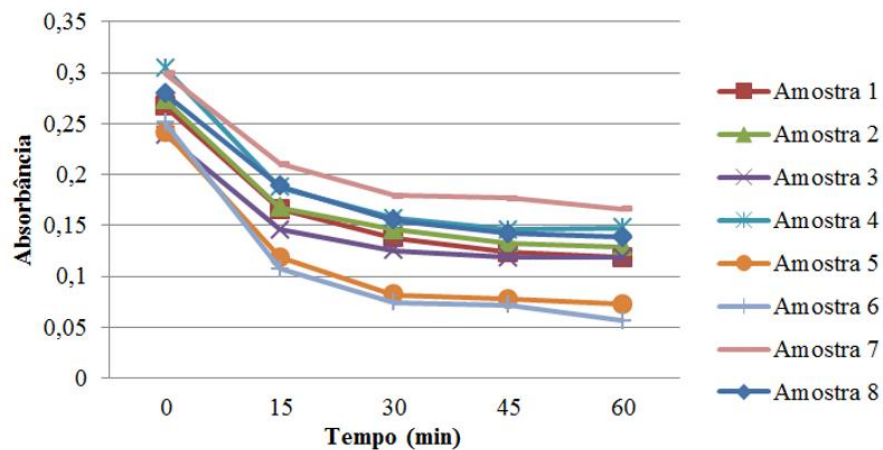
O gráfico de superfície de resposta mostra que no eixo z a resposta é em CF e nos eixos x e y, as variáveis  $X_1$  e  $X_2$ . Nas **Figuras 23, p. 52** e **24, p. 52** é possível observar que as condições que propiciam o aumento da quantificação dos compostos fenólicos, elas são  $X_1$  (**temperatura**) no seu nível máximo +1 e  $X_2$  (**granulometria**) no seu valor mínimo -1, em outras palavras,  $T = 60^\circ\text{C}$  e  $G = 0,10$  mm.

**Figura 23.** Gráfico da Superfície de Resposta para os Compostos Fenólicos

**Figura 16.** Curva de Nível para Compostos Fenólicos

### 5.2.3. Avaliação da Atividade Antioxidante

A Figura 25, p. 53 mostra a diminuição da absorvância, das amostras em análise, o qual proporcional à concentração e à atividade antioxidante.

**Figura 25.** Absorvâncias das amostras vs tempos de análises

Já a Tabela 13, p. 54 consta a atividade antioxidante determinada pelo ensaio de DPPH. Os resultados foram expressos em IC<sub>50</sub> e variaram de 9,01% (ensaio 6) à 14,03% (ensaio 7), valores muito bons quando comparado com atividade antioxidante dos extratos etanólicos da folha de *Croton heliotropiifolius* a concentração de 125 µg/mL, 93,29 µg/mL (ANGÉLICO, 2011). Devido ao ensaio 1 apresentar as mesmas condições de extração do ensaio 5, bem

como o 2, semelhante ao 6, 3, correlato ao 7 e 4, equivalente a 8, então esperava-se que os valores de atividade antioxidante fossem similares, o que de fato ocorreu.

As variáveis de entrada influenciaram bastante nos valores obtidos, além da composição química dos ensaios, especialmente com relação aos compostos fenólicos, o que tornou diferentes os valores dos ensaios que apresentavam condições físicas distintas na extração.

Portanto, atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas propriedades apresentam papel importante no sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição ou neutralização, agindo nas etapas de iniciação e propagação do processo oxidativo. (CHUN, 2005; HASLAM, 1996; SOARES, 2002).

**Tabela 13.** Resultados da variável de resposta Atividade Antioxidante

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

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

#### 4.2.3.1 Análise estatística da variável antioxidante (AA)

A análise de variância (**Tabela 14, p. 55**) mostrou que para as variáveis isoladas lineares  $X_1$  (T) e  $X_2$  (G) e a variável combinada  $X_1 \times X_2$  (T x G) não apresentaram significância um nível de significância menor ou igual a 5% do limite de confiança ( $p < 0,05$ ), onde mostra

uma menor probabilidade de estar na região de hipótese nula (sem significância estatística para a resposta). Desse modo, as variáveis de entrada, não influenciaram na variável de resposta (AA).

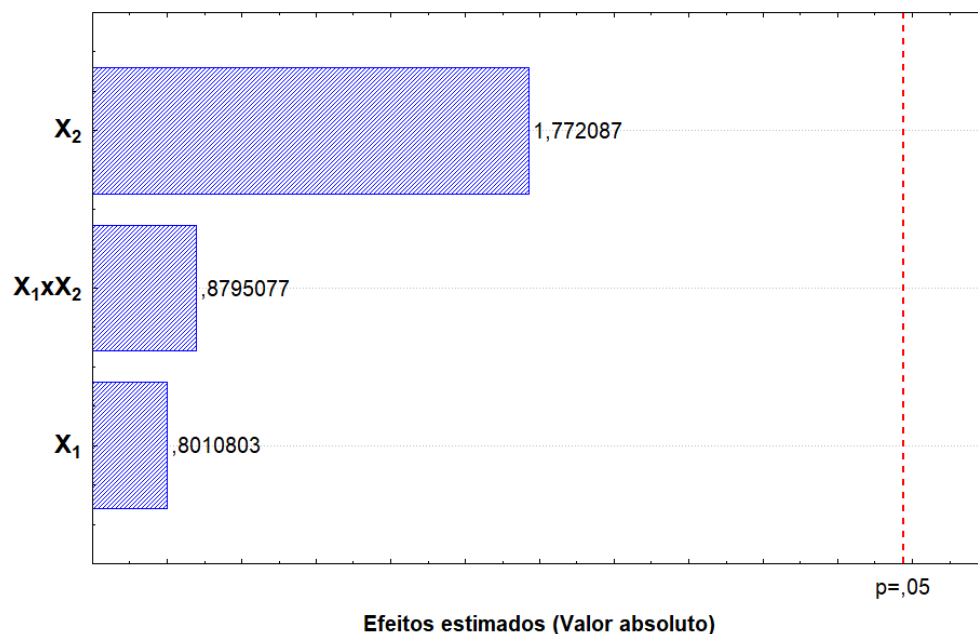
**Tabela 14.** ANOVA para Atividade Antioxidante

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

**Legenda:** SQ= Soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; MQ= média quadrática; p= Análise de probabilidade; X<sub>1</sub>= Temperatura; X<sub>2</sub>= Granulometria.

O gráfico de pareto (**Figura 26**), confirmou que as variáveis isoladas X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub> e combinadas X<sub>1</sub>xX<sub>2</sub> não apresentaram significância em 95% do limite de confiança, uma vez que as variáveis estão à esquerda da reta vertical indicativa do limite de rejeição da hipótese nula.

**Figura 26.** Gráfico de Pareto para a resposta Atividade Antioxidante



### 5.2.4 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Os extratos obtidos pela extração convencional da casca do *C. cajucara* foram submetidos ao teste do CIM, o qual é a menor quantidade de amostra necessária para a inibição do microrganismo. Porém, os extratos não inibiram os crescimentos das bactérias e fungo testados, apresentando uma CIM > 1000 µg/mL (**Tabela 15**), não havendo atividade inibitória do ponto de vista clínico nesta concentração. Resultado este semelhante ao do estudo de Leite (2011), o qual constatou que o óleo essencial do *Croton limae* não apresentou atividade antibacteriana frente à *Pseudomonas aeruginosa*.

Além disso, a resposta obtida no estudo de Azevedo (2010) constatou que o óleo essencial de *Croton cajucara* BENTH também não apresentou atividade antibacteriana frente à *Staphylococcus aureus* (CM > 1000 µg/mL).

Em comparação ao resultado encontrado para *Candida albicans* no presente estudo, Azevedo (2010) verificando o potencial antifúngico do óleo essencial do *Croton cajucara* BENTH, verificou a inexistência de atividade antifúngica frente à *C. albicans*. Da mesma forma que López (2010), analisando a atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto das folhas e das cascas de *Croton urucurana* BAIL, pelo método de poços de ágar, não encontrou atividade antifúngica frente a *C. albicans*.

**Tabela 15.** Resultados da Concentração Inibitória Mínima

| ENSAIOS | CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (µg/mL) |           |                     |                      |                 |                  |                    |
|---------|--|-----------|---------------------|----------------------|-----------------|------------------|--------------------|
|         | T<br>(°C)                              | G<br>(mm) | <i>P. mirabilis</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. typhi</i> | <i>S. aureus</i> | <i>C. albicans</i> |
| 1       | 50                                     | 0,10      | > 1000; SA          | > 1000; SA           | > 1000; AS      | > 1000; SA       | > 1000; SA         |
| 2       | 60                                     | 0,10      | > 1000; SA          | > 1000; SA           | > 1000; AS      | > 1000; SA       | > 1000; SA         |
| 3       | 50                                     | 0,51      | >1000; SA           | > 1000; SA           | > 1000; AS      | > 1000; SA       | > 1000; SA         |
| 4       | 60                                     | 0,51      | > 1000; SA          | > 1000; SA           | > 1000; AS      | > 1000; SA       | > 1000; SA         |
| 5       | 50                                     | 0,10      | > 1000; SA          | > 1000; SA           | > 1000; AS      | > 1000; SA       | > 1000; SA         |
| 6       | 60                                     | 0,10      | > 1000; SA          | > 1000; SA           | > 1000; AS      | > 1000; SA       | > 1000; SA         |
| 7       | 50                                     | 0,51      | > 1000; SA          | > 1000; SA           | > 1000; AS      | > 1000; SA       | > 1000; SA         |
| 8       | 60                                     | 0,51      | > 1000; SA          | > 1000; SA           | > 1000; AS      | > 1000; SA       | > 1000; SA         |

**Legenda:** T= temperatura; G= granulometria; mm= milímetro; °C= Graus Celsius.

Além disso bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Enterobacter spp* (TRABULSI et al., 2005), *Proteus mirabilis* e *Salmonella typhi* apresentam uma morfologia complexa de suas membranas externas, o qual apresentam uma dupla camada de lipídios, contendo moléculas de proteínas e lipoproteínas ligadas ao peptidoglicano. Vale ressaltar também que agregado à membrana externa há um conjunto de enzimas responsáveis pela inativação de algumas substâncias com ação antibacteriana denominado espaço periplasmático. Isso justifica a dificuldade do extrato do *C. cajucara* em penetrar essa membrana, sendo assim, não apresentando atividade inibitória.

Estudos afirmam que a atividade antimicrobiana não está diretamente ligada com a capacidade antioxidante do extrato e concentração de compostos fenólicos (BRASIL et al., 2009).

De modo geral *C. cajucara* Benth apresenta compostos como *trans*-desidrocrotonina (DCTN), *trans*-crotonina (CTN), *cis*-cajucarina B (c-CJC-B), *trans*-cajucarina B (t-CJC-B) e cajucarina A (CJC-A) (MACIEL et al., 2007a; 2006a; 2006b; 2003; 2002b; 2000; 1998a; 1998b) não apresentando atividade antimicrobiana, diferente do *Croton palanostigma* KLOTZSCH o qual possui em sua composição química compostos como diterpenos cordatina e aparisthmano e flavonoides que podem influenciar na atividade antimicrobiana mais eficiente em relação a planta analisada neste estudo (RODRIGUES, 2013).

### 5.2.5. Função Desejabilidade

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

Na **Tabela 16, p. 58** observa-se os valores atribuídos para a otimização do processo extrativo (Statistica® 7.0). Para isso foram empregados os valores numéricos para o limite inferior (LI), valor mediano (M) e limite superior (LS), bem como, os valores dos expoentes  $s$  e  $t$ . Esses valores indicam a importância da função para encontrar o valor médio desejado. O valor 0 significa que o valor é indesejado, 0,5 moderadamente desejado e 1 muito desejado.

**Tabela 16.** Parâmetros utilizados na otimização das respostas Rendimento e Compostos Fenólicos

| RESPOSTAS | LI        | M           | LS        | s  | t  |
|-----------|-----------|-------------|-----------|----|----|
| RD        | 5,15 (0)  | 7,13 (0,5)  | 9,11 (1)  | 10 | 10 |
| CF        | 26,98 (0) | 38,65 (0,5) | 50,32 (1) | 10 | 10 |

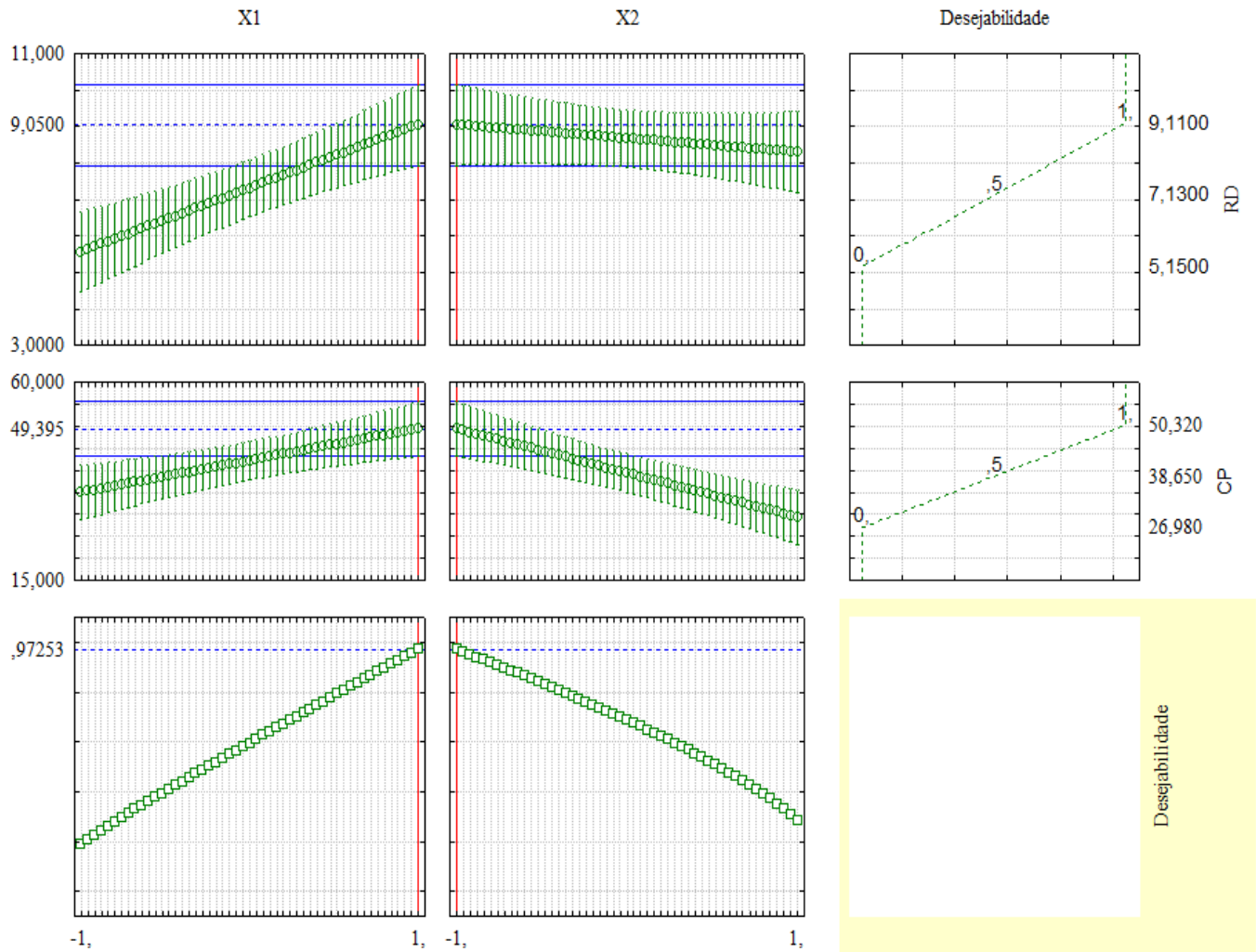
**Legenda:** RD= Rendimento; CF= Compostos Fenólicos; L= Limite Inferior; M= Mediana; LS= Limite Superior.

O diagrama da Função Desejabilidade, mostrado na **Figura 27, p. 59** usando os coeficientes  $s$  e  $t = 10$  e fator de grade igual a 50, apresentou um coeficiente de desejabilidade global (D) 0,9725 ou 97,25%, o qual é considerável uma resposta aceitável e excelente. Ademais, considerado o valor de desejabilidade 1, acima de 9% para a variável de resposta Rendimento e acima de 50%, para a variável de resposta Compostos Fenólicos. Os níveis das variáveis  $X_1$  (T) e  $X_2$  (G) que otimizam as respostas são mostrados através das linhas em vermelho o que corresponde à 1 e -1 respectivamente, ou seja,  $T = 60^\circ\text{C}$  e  $G = 0,10$  mm.

Os valores ótimos para as variáveis de resposta são mostrados através das linhas tracejadas horizontais em azul, onde mostram que o valor ótimo para Rendimento seria de **9,05%**, já para a variável de resposta Compostos Fenólicos **49,39%**.

**Figura 27.** Valores preditos para as variáveis de resposta Rendimento e Compostos

Fenólicos e função desejabilidade



Na **Tabela 17, p. 60** são mostradas as variáveis codificadas, de entrada e seus respectivos valores das respostas Rendimento, Compostos Fenólicos, Atividade Antioxidante e Concentração Inibitória Mínima, os quais foram obtidos a partir da extração da casca do caule do *C. cajucara*, como mostrado anteriormente.

**Tabela 17.** Respostas rendimento, Compostos fenólicos, Atividade antioxidante e antimicrobiana para a extração convencional

| ENSAIOS | VARIÁVEIS CODIFICADAS |                | VAVIÁVEIS DE ENTRADA |             | VARIÁVEIS DE RESPOSTA (UND) |               |                         |  |                      |                 |                  |                    |
|---------|-----------------------|----------------|----------------------|-------------|-----------------------------|---------------|-------------------------|--|----------------------|-----------------|------------------|--------------------|
|         |                       |                | T (°C)               | G (mm)      | RD (%)                      | CF (mg EAG/g) | AA IC <sub>50</sub> (%) | CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (µg/mL) |                      |                 |                  |                    |
|         | X <sub>1</sub>        | X <sub>2</sub> |                      |             |                             |               |                         | <i>P. mirabilis</i>                    | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. typhi</i> | <i>S. aureus</i> | <i>C. albicans</i> |
| 1       | -                     | -              | 50                   | 0,10        | 5,98                        | 32,33         | 10,80                   | > 1000; SA                             | > 1000; SA           | > 1000; SA      | > 1000; SA       | > 1000; SA         |
| 2       | +                     | -              | 60                   | 0,10        | 8,99                        | 48,47         | 13,63                   | > 1000; SA                             | > 1000; SA           | > 1000; SA      | > 1000; SA       | > 1000; SA         |
| 3       | -                     | +              | 50                   | 0,51        | 5,71                        | 36,30         | 11,10                   | > 1000; SA                             | > 1000; SA           | > 1000; SA      | > 1000; SA       | > 1000; SA         |
| 4       | +                     | +              | 60                   | 0,51        | 8,96                        | <b>26,98</b>  | <b>14,03</b>            | >1000; SA                              | > 1000; SA           | > 1000; SA      | > 1000; SA       | > 1000; SA         |
| 5       | -                     | -              | <b>50</b>            | <b>0,10</b> | <b>5,15</b>                 | 37,60         | 9,45                    | > 1000; SA                             | > 1000; SA           | > 1000; SA      | > 1000; SA       | > 1000; SA         |
| 6       | +                     | -              | <b>60</b>            | <b>0,10</b> | <b>9,11</b>                 | <b>50,32</b>  | <b>9,01</b>             | > 1000; SA                             | > 1000; SA           | > 1000; SA      | > 1000; SA       | > 1000; SA         |
| 7       | -                     | +              | 50                   | 0,51        | 5,34                        | 41,47         | 8,94                    | > 1000; SA                             | > 1000; SA           | > 1000; SA      | > 1000; SA       | > 1000; SA         |
| 8       | +                     | +              | 60                   | 0,51        | 7,64                        | 31,71         | 13,11                   | > 1000; SA                             | > 1000; SA           | > 1000; SA      | > 1000; SA       | > 1000; SA         |

**Legenda:** T= temperatura; G= granulometria; °C= graus Celsius; mm= milímetro; RD= rendimento da extração; CP= Compostos Fenólicos; AA= Atividade Antioxidante; %= Porcentagem; µg/mL= micrograma por mililitro; mg EAG/g= miligrama de Equivalentograma de Ácido Gálico por grama de amostra; IC<sub>50</sub>: Índice de Concentração de redução a 50% do DPPH; SA: Sem atividade.

## 6 CONCLUSÃO

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

Em relação à resposta Rendimento, a variável de entrada isolada **X<sub>1</sub> (Temperatura)** fora a que apresentou maior efeito na obtenção de seus valores. Já para a variável de resposta Compostos Fenólicos, foi possível observar que as variáveis codificadas individuais **X<sub>2</sub> (Granulometria)** e combinada **X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> (Temperatura x Granulometria)**, foram significativos. Vale ressaltar que esses valores foram comprovados através análise de efeitos estimados, coeficientes de regressão, análise de variância, gráfico de pareto e modelo matemático proposto. Entretanto, para a atividade antioxidante as variáveis de entrada não apresentaram significância estatística.

De modo geral, os níveis para as variáveis codificadas **X<sub>1</sub>** e **X<sub>2</sub>** ideais para obtenção dos maiores valores das variáveis de resposta significativas foram +1 e -1, ou seja, temperatura de extração de 60°C e granulometria do material botânico de 0,10 mm.

## **7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Adicionar a temperatura de secagem como variável de entrada;
- Comparar os resultados das variáveis de resposta entre os métodos de extração convencional e supercrítica.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHANAZAROVA, S. and KAFAROV, V. Experiment Optimization on Chemistry and Chemical Engineering. **Mir Publishers**, p. 312. 1982.
- 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.
- 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.
- ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n. 3, p. 464-471, 2007.
- ANGÉLICO, E. C.; **Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *Croton heliotropifolius* KUNTE e *Croton blanchetianus* BAILL.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde Tecnologia Rural. Patos – PB: UFCG, CSTR. 2011.
- 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.
- ARAÚJO, E. C. et al. Use of medicinal plants by patients with cancer of public hospitals in João Pessoa (PB). **Revista Espaço para a Saúde**, v. 8, n. 2, p. 44-52, 2007.
- ARAÚJO-JÚNIOR, V. T. de et al. Muscicapines, a new class of guaiane-type sesquiterpene alkaloids from *Croton muscicapa*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 3B, p. 553-557, 2005.
- AZEVEDO, M. M. B. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais de *Croton cajucara* Benth. e *Croton sacaquinha* Croizat. e obtenção de seus componentes bioativos.** 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 3, p. 444-7, 2007.
- BARRETO JR., A.G., BISCAIA Jr., E.C., VEIGA Jr., V.F., PINTO, A.C., CARVALHAES, S.F., MACIEL, M.A.M. Ion-exchange chromatography applied to the isolation of acidic fraction from copaiba (*Copaifera multijuga*) oil and from sacaca (*Croton cajucara*). **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 719-722, 2005.

BARRETO, Milena B. et al. Flavonoids and terpenoids from *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 675-679, 2013.

BARROSO, G. M. et al. Frutos e sementes: Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. **Viçosa, Editora UFV**, 2004.

BELLA CRUZ, A. B. et al. Métodos “In Vitro” na Avaliação da Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL-FILHO, V. **Fármacos e Medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, cap. 7. p. 175-205, 2010

BERRY, P. E. et al. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 9, p. 1520-1534, 2005.

BITTNER, M. et al. Estudio Químico de especies de la Familia Euphorbiaceae en Chile. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 46, n. 4, p. 419-431, 2001.

BLASCO, A. J.; GONZÁLEZ, M. C.; 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**, v. 511, n. 1, p. 71-81, 2004.

BLOCK, S. et al. Induction of apoptosis in human promyelocytic leukemia cells by a natural trachylobane diterpene. **Anticancer research**, v. 25, n. 1A, p. 363-368, 2004.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensmittel- Wissenschaft und-Technologie**, v.30, n.6, p.609-615, 1997.

BOTTERWECK, A. A. M. et al. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 7, p. 599-605, 2000.

BOUCHET, N.; BARRIER, L.; FAUCONNEAU, B. Radical scavenging activity and antioxidant properties of tannins from *Guiera senegalensis* (Combretaceae). **Phytotherapy research**, v. 12, n. 3, p. 159-162, 1998.

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

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E. .; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL, D. S. B. et al. Essential oil composition of *Croton palanostigma* Klotzsch from north Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1188-1192, 2009.
- BRANDÃO, M. G. L; Dossê Técnico, Produção de chás e extratos de plantas medicinais. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, pg. 17. 2007.
- BRAZ-FILHO, R. Brazilian phytochemical diversity: bioorganic compounds produced by secondary metabolism as a source of new scientific development, varied industrial applications and to enhance human health and the quality of life. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 9, p. 1663-1672, 1999.
- BREMER, Birgitta et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2009.
- BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Microbiología médica. **Rio**, v. 498, 2000.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 131-134, 2005.
- CAMPOS, A. R. et al. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia**, v. 73, n. 2, p. 116-120, 2002.
- CARVALHO, A. C. B. et al. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v. 5, n. 11, p. 26-32, 2007.
- CAVIN, A. et al. Use of on-flow LC/1 H NMR for the study of an antioxidant fraction from *Orophea* e *neandra* and isolation of a polyacetylene, lignans, and a tocopherol derivative. **Journal of natural products**, v. 61, n. 12, p. 1497-1501, 1998.
- CHUN, S.S et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 809-816, 2005.
- 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).
- COKER, C. et al. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **Microbes and infection**, v. 2, n. 12, p. 1497-1505, 2000.
- COOPER-PATRICK, L. et al. Race, gender, and partnership in the patient-physician relationship. **Jama**, v. 282, n. 6, p. 583-589, 1999.

CORDEIRO, I. et al. Croton in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2014.

CORDEIRO, I. **Revisão taxonômica de Julocroton Mart. (Euphorbiaceae)**. 1993. Tese de Doutorado. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1993.

COSTA, D. A., SILVA, D. A., CAVALCANTI, A. C., MEDEIROS, M. A. A., LIMA, J. T., CAVALCANTE, J. M. S., SILVA, B. A. Chemical constituents from *Bakeridesia pickelli* MONTEIRO (Malvaceae) and the relaxant activity of kaemperol-3-O-r-D-(6''-E-pcoumaroyl) glucopyranoside on guineapig ileum. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 901-903, 2007.

COUTINHO, M. P. L.; ARAÚJO, L. F.; GONTIÈS, B. Uso da maconha e suas representações sociais: estudo comparativo entre universitários. **Psicologia em estudo**, v. 9, n. 3, p. 469-477, 2004.

CROSSLEY, Kent B. et al. (Ed.). **Staphylococci in human disease**. John Wiley & Sons, 1997.

DAHANUKAR, S. A. et al. Pharmacology of medicinal plants and natural products. **Indian journal of pharmacology**, v. 32, n. 4, p. S81-S118, 2000.

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.

DECKER, E. A. 18 Antioxidant Mechanisms. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**, p. 475, 2008.

DERRINGER, G. and SUICH, R. Simultaneous optimization of several variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12 n. 4, p. 214-19. 1980.

DI STASI, L. C. et al. Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of Sao Paulo. **Journal of ethnopharmacology**, v. 24, n. 2-3, p. 205-211, 1988.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

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

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5º Ed. Brasília. 2010.

FEIL, E. J. et al. How clonal is *Staphylococcus aureus*?. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 11, p. 3307-3316, 2003.

FERRAZ, E. M. N. Variação florístico-vegetacional na região do vale do Pajeú, Pernambuco. **Recife: UFRPE**, 1996.

FEY, P. D. et al. Comparative molecular analysis of community-or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 196-203, 2003.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar, trad. **Maria Carolina Mardi Guimarães e Cristina Leonhardt. Porto Alegre: Artmed**, 2002.

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

GOMEZ-POMPA, A. Posible papel de la vegetación secundaria en la evolución de la flora tropical. **Biotropica**, p. 125-135, 1971.

GONZÁLEZ, G. L. **La guía de Incafo de los árboles y arbustos de la Península Ibérica**. Incafo, 1982.

GORDON, Rachel J.; LOWY, Franklin D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. Supplement\_5, p. S350-S359, 2008.

GRYNBERG, N. F. et al. Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, transdehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, v. 65, n. 8, p. 687-689, 1999.

GUTFINGER, T. Polyphenols in olive oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 11, p. 966-968, 1981.

HAESBAERT, R.; LIMONAD, E. O território em tempos de globalização. **Etc., Espaço, Tempo e Crítica, Revista Eletrônica de Ciências Sociais Aplicadas e outras coisas**, p. 1-15, 2007.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HARLEY, R. M. Introduction. In: STANNARD, BL (ed.) **Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil**. Royal Botanic Garden: Kew, p.1-42. 1995.

HASLAM, E.. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of natural products**, v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.

HELUANI, C. S. et al. Three New Diterpenoids Based on the Novel Sarcopetalane Skeleton from *Croton sarcopetalus*. **Journal of natural products**, v. 63, n. 2, p. 222-225, 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. et al. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* BENTH.(Euphorbiaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 69, n. 3, p. 229-234, 2000.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOTTA, H. et al. Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1526, n. 2, p. 159-167, 2001.

HRAZDINA, G.; BORZEL, A. J.; ROBINSON, W. B. Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5-diglucosides. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 21, n. 4, p. 201-204, 1970.

ICHIHARA, Y., TAKEYA, K., HITOTSUYANAGI, Y., MORITA, H., OKUYAMA, S., SUGANUMA, M., FUJIKI, H., MOTIDOME, M., ITOKAWA, H. Cajucarinolide and isocajucarinolide: antiinflammatory diterpenes from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, v. 58, n. 6, p. 549-551, 1992.

ITOKAWA, H., ICHIHARA, Y., KOJIMA, H., WATANABE, K., TAKEYA, K. Norclerodane diterpenes from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 6, p. 1667-1679, 1990.

JAY, J. M. Microbiologia de alimentos Artmed. **Porto Alegre**, v. 711, 2005.

KLUYTMANS, J. A. J. W.; WERTHEIM, H. F. L. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. **Infection**, v. 33, n. 1, p. 3-8, 2005.

KUBO, I., ASAKA, Y., SHIBATA, K. Insect growth inhibitory nor-diterpenes, cisdehydrocrotonin and trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2545-2546, 1991.

LEAL, R. S. Estudo etnofarmacológico e fitoquímico das espécies medicinais *Cleome spinosa* Jacq, *Pavonia varians* Moric e *Croton cajucara* BENTH. 2008.

LEITE, T. R. **ANÁLISE BIOLÓGICA E QUÍMICA DE *Croton limae* A. P. S. GOMES, M. F. SALES & P. E. BERRY (EUPHORBIACEAE)**. 2011. 78 p. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Faculdade de Biologia. Ceará. Universidade Regional do Cariri. 2011.

LIMA, I. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LIMA, L. R. **Estudos taxonômicos em *Croton* seção *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae)**. 2006. Tese de Doutorado.

LIMA, M. R. F. et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 105, n. 1, p. 137-147, 2006.

LOPES, D. et al. Essential oil from leaves of *Croton sakaquinha* BENTH. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 1, p. 48-49, 2003.

LÓPEZ, P. V. A. **Bioprospeção de extratos de *Croton urucurana* Baill e seus fungos endofíticos**. 2010. 137 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná.

LORDÉLO, C. S. M. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J.; FRANCISCO, J. M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2002.

LUNA COSTA, A. M., SILVA, J. C. R., CAMPOS, A. R., RAO, V. S. N., MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C. Antiestrogenic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 8, p. 689-691, 1999.

MACHADO, M. M. Perfil fitoquímico e avaliação dos principais efeitos biológicos e imunológicos in vitro da *Euphorbia tirucalli* L. **Universidade Federal de Santa Maria—Centro de Ciências da Saúde**. São Paulo, 2007.

MACIEL, M. A. M, PINTO, A.C, BRABO, S.N., SILVA, M.N. Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3, p 823-828, 1998b.

MACIEL, M. A. M, PINTO, A.C., KAISER, C.R. NMR and structure review of some natural furoclerodanes. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 278-282, 2003.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACIEL, M. A. M. **Croton cajucara: uma escolha etnobotânica**. 1997.

MACIEL, M. A. M., CORTEZ, J. K. P. C., GOMES, F. E. S. O gênero *Croton* e aspectos relevantes de diterpenos clerodanos. **Revista Fitos**, v. 2, n. 3, p. 54–73, 2006a.

MACIEL, M. A. M., GOMES, F. E. S., PINTO, A. C., CÓLUS, I. M. S., MAGALHÃES, N. S. S., GRYNBERG, N.F., ECHEVARRIA, A. Aspectos sobre Produtos Naturais na Descoberta de Novos Agentes Antitumorais e Antimutagênicos. **Revista Fitos**, v. 3, n. 1, p. 38-59, 2007b.

MACIEL, M. A. M., MARTINS, J. R., PINTO, A. C., KAISER, C. R., ESTEVES-SOUZA, A., ECHEVARRIA, A. Natural and semi-synthetic clerodanes of *Croton cajucara* and their

cytotoxic effects against Ehrlich carcinoma and human k562 leukemia cells. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 391-396, 2007a.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., ARRUDA, A. C., PAMPLONA, S. G. S. R., VANDERLINE, F. A., LAPA, A. J., ECHEVARRIA, A., GRYNBERG, N. F., CÔLUS, I. M. S., FARIAS, R. A. F., LUNA COSTA, A. M., RAO, V. S. N. Ethnopharmacology, Phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of Croton cajucara. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 1, p. 41-55, 2000.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., BRABO, S. N., ARRUDA, A. C. Estudo da variação dos teores de terpenóides bioativos isolados das cascas do caule de Croton cajucara, nativos e cultivados no estado do Pará. **Revista da Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 18-20, n. 1-2, p. 17-34, 1998a.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA J. R., MARTINS, J. R., GRYNBERG, N. F., ECHEVARRIA, A., LAPA, A. J., VANDERLINDE, F. A Croton cajucara as an alternative to traditional medicine in a modern health system. **Recent Progress in Medicinal Plants-Phytochemistry and Pharmacology**, v. 8, p. 502-517, 2002a.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA J. R., V. F., ECHEVARRIA, A., GRYNBERG, N.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002b.

MACIEL, M. A. M.; CORTEZ, J. K. P. C.; GOMES, F. E. S. O gênero Croton e aspectos relevantes de diterpenos clerodanos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 2, n. 03, p. 54-73, 2013.

MARAMBIO, O. G.; ACUÑA, P. F.; DEL CARMEN PIZARRO, G. **Métodos experimentales de química orgánica**. Ediciones Universidad Tecnológica Metropolitana, 2007.

MARONPOT, R. R.; PETERSON, L. G. Spontaneous proteus nephritis among male C3H/HeJ mice. **Laboratory animal science**, v. 31, n. 6, p. 697-700, 1981.

MATKOWSKI, A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants – A review. **Biotechnology Advances**, v 26, p 548-560, 2008.

MIOTTO, A. M. et al. Perfil lipídico e sensibilidade adrenergica em atrio direito de ratos normo e hipercolesterolemicos tratados ou não com infuso das cascas de Croton cajucara Benth. 2001.

MONTEIRO, J. M. et al. The effects of seasonal climate changes in the caatinga on tannin levels in Myracrodruon urundeuva (Engl.) Fr. All. and Anadenanthera colubrine (Vell.) Brenan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 338-344, 2006.

MORIMITSU, M.; OKAZAKI, A. A Novel Electrode Material for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oxidation of Electrochemical Glucose Sensors. **ECS Transactions**, v. 19, n. 6, p. 211-218, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NETO, B. Barros; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos, Editora da Unicamp. 2007.

NOGUEIRA, M. J. C. Fitoterapia popular e enfermagem comunitária.[livre docência]. **São Paulo (SP): Escola de Enfermagem da USP**, 1983.

O'HARA, C. M.; BRENNER, F. W.; MILLER, J. M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 4, p. 534-546, 2000.

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

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, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Rev. bras. plantas med**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

PAIVA Jr, I.M.; SILVA, S.I.; ARAÚJO, E.L. Ocorrência e distribuição de Euphorbiaceae na Zona da Mata de Pernambuco. In: REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 13, 2000, Pernambuco. **Anais...** Pernambuco: RNBOT, 2000. p.114.

PAVIANI, E. R; STADNIK, C. B.; HEINEK, I. Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa*. **Infarma**, v. 15, n. 11-2, p. 11-2, 2004.

RAJESH, R. et al. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. **Biochimie**, v. 88, n. 10, p. 1313-1322, 2006.

RAUHA, J. P. Antimicrobial effects of finish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v.56, n.1., p.3-12, 2000.

REISCHE, D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. 15 Antioxidants. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**, p. 409, 2008.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of Flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RISCO, E. et al. Immunomodulatory activity and chemical characterisation of sangre de drago (dragon's blood) from *Croton lechleri*. **Planta medica**, v. 69, n. 09, p. 785-794, 2003.

RODRIGUES, C. C. **Estudo de métodos de extração, quantificação de compostos fenólicos, avaliação de atividades antioxidante e antimicrobiana da casca do caule de *Croton palanostigma* Klotzsch**. Belém: Universidade Federal do Pará, 2017.

RODRIGUES, C. C. **Quantificação de polifenóis totais, determinação da capacidade antioxidante e da atividade antimicrobiana do estrato da casca de *Croton Palanostigma* KI**. Tese de conclusão de curso - Departamento de Engenharia química. Belém: Universidade Federal do Pará. 2013.

ROGÉRIO, A. P., et al. Anti-asthmatic potential of a d-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology**, v.17, p. 795-804, 2007.

ROGINSKY, Vitaly; LISSI, Eduardo A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

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.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SANDOVAL, Miguel et al. Evaluación de la toxicidad hepática y renal aguda y subaguda del látex de *Croton palanostigma* (sangre de grado) en animales de experimentación. In: **Anales de la Facultad de Medicina**. UNMSM. Facultad de Medicina, 2005. p. 119-126.

SANTOS-FILHO, F.S.; SALES, M.F.; LUCENA, M.F.A. Levantamento preliminar da família Euphorbiaceae Juss. do Parque Estadual Zoobotânico na cidade de Teresina, Piauí, Brasil. In: REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 13, 2000, Pernambuco **Anais...** Pernambuco: RNBOT, 2000. p. 90.

STAHL, M. L.; WILLIAMS, F. D. Immunofluorescent evidence of *Proteus mirabilis* swarm cell formation on sterilized rat feces. **Applied and environmental microbiology**, v. 41, n. 3, p. 801-806, 1981.

SWAIN, Tony; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.

SCHAECHTER, M. et al. Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas. 2002.

SCOPEL, M. **Análise Botânica, Química e Biológica Comparativa entre Flores das Espécies *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schldl. e Avaliação Preliminar da Estabilidade.** 2005. 227 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre. 2005.

SILVA, B. A. et al. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. **Food chemistry**, v. 90, n. 1, p. 157-167, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; DE MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000.

SIMÕES, J. C. et al. Desidrocrotonina, um norditerpeno de *Croton cajucara* BENTH (Euphorbiaceae). **Ciencia e cultura-Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciencia**, 1979.

SOARES, M. C. P. Would sacaca, *Croton cajucara* BENTH (Euphorbiaceae) be an hepatotoxic plant like Germander, *Teucrium chamaedrys* L. (Labiatae)?. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 96-97, 2004.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, 2002.

SONG, W.; WOO, H.J.; KIM, J.S.; LEE, K.M. In vitro activity of blactams in combination with other antimicrobial agents against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, p.8-12, 2003.

SOUSA, C.

M de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, M. A. et al. Isolation and partial characterization of a D-galactose-binding lectin from the latex of *Synadenium carinatum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 5, p. 705-716, 2005.

SOUZA, T. M. et al. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-mimosaidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 221-226, 2007.

STAHL, M. L.; WILLIAMS, F. D. Immunofluorescent evidence of *Proteus mirabilis* swarm cell formation on sterilized rat feces. **Applied and environmental microbiology**, v. 41, n. 3, p. 801-806, 1981.

SWADDIWUDHIPONG, W.; TANGKITCHOT, T.; SILARUG, N. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* postoperative endophthalmitis caused by contaminated intraocular irrigating solution. **Transr Soc Trop Med Hyg**, v.89, n.3, p.288-89, 1995.

SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Punnus domestica*. Iquantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.19, p.63-68, 1959.

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.

TIEPPO, M. **Croton Cajucara Benth (SACACA) uma planta da Amazônia. Avaliação do seu potencial antioxidante**. 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

TIVERON, Ana Paula. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

TRABULSI, Edouard J.; GUILLONNEAU, B. Laparoscopic radical prostatectomy. **The Journal of urology**, v. 173, n. 4, p. 1072-1079, 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. *Microbiologia*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TRINDADE, M. T. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 4, 2015.

VAN ACKER, S. A. B. E. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

VAN DEN BERG, L. et al. Urban Europe: A study of growth and decline. 1982.

VAN, E. E., Benjamin, W.; BERRY, P. E. Croton section *Pedicellati* (Euphorbiaceae), a novel new world group, and a new subsectional classification of Croton section *Lamprocroton*. **Systematic Botany**, v. 36, n. 1, p. 88-98, 2011.

VEIGA Jr., V. F., PINTO, A. C., MACIEL, M. A. M. Plantas Mediciniais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WEBSTER, Grady L. Realignments in American Croton (Euphorbiaceae). **Novon**, p. 269-273, 1992.

WEBSTER, Grady L. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 33-144, 1994.

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