

Otimização da extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos das folhas de *Croton blanchetianus* Baill. e análise cromatográfica

Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Croton blanchetianus* Baill. leaves and chromatographic analysis

J. M. Silva¹; R. A. Jesus¹; J. M. A. Oliveira¹; M. A. Silva¹; R. S. Ribeiro²;
L. F.A. Nascimento²; R. S. Costa²; A. F. Blank²; P. C. L. Nogueira¹;
V. R. S. Moraes^{1*}

¹Departamento de Química, Universidade Federal de Sergipe, 49107-230, São Cristóvão-SE, Brasil

²Departamento de Engenharia Agronômica, Universidade Federal de Sergipe, 49107-230, São Cristóvão-SE, Brasil

*valrsmoraes@uol.com.br

(Recebido em 23 de janeiro de 2025; aceito em 28 de julho de 2025)

No presente estudo foi realizada a otimização de extração de compostos fenólicos a partir das folhas de *Croton blanchetianus* por extração assistida por ultrassom (EAU), avaliando o efeito das variáveis concentração de etanol em água, relação solvente para sólido e tempo de extração por meio de um planejamento Box-Behnken, e a comparação dos resultados fitoquímicos e antioxidantes obtidos pelos extratos otimizados com aqueles dos extratos preparados por métodos convencionais de extração (infusão e decocção). Os resultados mostraram que as melhores condições de extração foram: concentração de etanol 40,40%, relação solvente para sólido de 72,52 mL/g e tempo de 20,67 min, o que resultou em um TFT (teor de fenólicos totais) de $154,99 \pm 3,96$ mg EAG/g ms. O extrato obtido nas condições otimizadas apresentou valores de TFT, teor de flavonoides totais (TFLT) e atividade antioxidante maior que aqueles de infusão e decocção, constatando que o método EAU foi superior aos demais métodos extrativos quanto à recuperação de compostos fenólicos. Através dos perfis cromatográficos dos extratos obtidos pelas diferentes técnicas extrativas, foram observados a presença de compostos químicos pertencentes as classes dos ácidos fenólicos, fenilpropanoides e flavonoides. Assim, este estudo inicial de avaliação das variáveis que afetam a extração de compostos fenólicos a partir da espécie *C. blanchetianus* servirá de base para a realização de estudos adicionais com essa espécie medicinal visando a obtenção de preparações enriquecidas de compostos fenólicos biologicamente ativos.

Palavras-chave: flavonoides, perfil cromatográfico, antioxidantes.

In the present study, the optimization of the extraction of phenolic compounds from *Croton blanchetianus* leaves by ultrasound-assisted extraction (UAE) was carried out, evaluating the effect of the variables ethanol concentration in water, solvent-to-solid ratio and extraction time using a Box-Behnken design, and comparing the phytochemical and antioxidant results obtained by the optimized extracts with those of the extracts prepared by conventional extraction methods (infusion and decoction). The results showed that the best extraction conditions were: ethanol concentration of 40.40%, solvent-to-solid ratio of 72.52 mL/g and time of 20.67 min, which resulted in a TPC (total phenolic content) of 154.99 ± 3.96 mg EAG/g ms. The extract obtained under optimized conditions presented values of TPC, total flavonoid content (TFC) and antioxidant activity higher than those of infusion and decoction, confirming that the UAE method was superior to the other extraction methods regarding the recovery of phenolic compounds. Through the chromatographic profiles of the extracts obtained by the different extraction techniques, it was observed the presence of chemical compounds belonging to the classes of phenolic acids, phenylpropanoids and flavonoids. Thus, this initial study of evaluation of the variables that affect the extraction of phenolic compounds from the species *C. blanchetianus* will serve as a basis for carrying out additional studies with this medicinal species aiming at obtaining preparations enriched with biologically active phenolic compounds.

Keywords: flavonoids, chromatographic profile, antioxidants.

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais figuram há muitos anos como fontes alternativas para o alívio de doenças. No Brasil, essa forma de tratamento é utilizada para enfermidades tanto agudas quanto crônicas, justificando o constante interesse por fitoterápicos e produtos derivados de plantas, devido à presença de metabólitos secundários em sua composição como, por exemplo, ácidos fenólicos, fenilpropanoides e flavonoides [1-3].

Entre as diversas plantas medicinais encontradas no Brasil, podemos destacar aquelas do gênero *Croton* (família Euphorbiaceae) que compreende mais de 1300 espécies de plantas distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo classificadas como árvores, arbustos e ervas. Em relação à constituição química, plantas do gênero *Croton* apresentam metabólitos secundários da classe dos terpenoides, como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenoides e triterpenoides, além de alcaloides e compostos fenólicos, como flavonoides, lignoides e proantocianidinas [4].

As espécies representativas do gênero possuem efeitos farmacológicos diversos como atividades antilipidêmicas, cicatrizantes, gastroprotetoras, antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antimalárica, antioxidantes, anticâncer, entre outras [4]. Essa diversidade de efeitos farmacológicos torna os representantes desse gênero atrativos para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos e produtos de interesse econômico.

A espécie *Croton blanchetianus* Baill, também conhecida como marmeleiro-da-caatinga, é uma espécie endêmica da vegetação da caatinga brasileira [5]. Como composição química podemos citar os diterpenos, os quais são os principais responsáveis pela expressão de seus efeitos farmacológicos antimicrobianos, antiinflamatórios e gastroprotetores [6]. Além disso, extratos etanólicos das folhas apresentam alcalóides, açúcares redutores, derivados do ácido cinâmico, entre outros constituintes químicos [7]. Popularmente, o uso das folhas e cascas convergem em sua composição química, pois são indicadas para distúrbios gastrointestinais, reumatismo e cefaleia [6].

Recentemente, um estudo utilizando modelos de roedores com uma fração enriquecida em flavonoides proveniente das folhas de *C. blanchetianus* revelou um efeito antinociceptivo significativo, atuando sobre os sistemas opioide e colinérgico, destacando o potencial bioativo dessa espécie [8].

Estudos têm demonstrado que os metabólitos secundários podem também exprimir efeitos biológicos antibacterianos, anticâncer e antienvhecimento [9-11]. Além disso, as plantas medicinais apresentam em sua composição diversos compostos polifenólicos, como flavonoides, ácidos fenólicos e antocianinas, os quais podem atuar como antioxidantes e combater o estresse oxidativo no organismo humano, que está associado à patogênese e à fisiopatologia de inúmeros impasses crônicos à saúde, como doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, doenças neurodegenerativas, câncer e envelhecimento [12].

Um dos métodos eficazes para a extração destes compostos é a extração assistida por ultrassom (EAU), considerada um método extrativo sustentável e conveniente se comparado aos métodos convencionais, pois demanda tempos de extração reduzidos, baixo uso de solventes, utilização de poucos aparelhos, refletindo em baixos impactos econômicos e ambientais [13, 14].

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi otimizar a extração de compostos fenólicos das folhas de *Croton blanchetianus* por ultrassom, utilizando um planejamento Box-Behnken (BBD), avaliando para isso o efeito de diferentes variáveis (concentração de etanol em água, relação solvente para sólido e tempo de extração) no processo de extração. Além disso, foi realizado a comparação dos resultados fitoquímicos e da atividade antioxidante obtidos por EAU com aqueles dos extratos preparados por métodos convencionais de extração (infusão e decocção), sendo todos eles utilizados para gerar um perfil cromatográfico, através de um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), para a indicação da presença de diferentes classes de fenólicos em suas composições.

2. METODOLOGIA

2.1 Reagentes e solventes

Metanol grau HPLC (TEDIA, Fairfield, OH, EUA) foi usado nas análises cromatográficas. Etanol grau analítico foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Ácido fórmico grau analítico (85% v/v) foi adquirido da Dinâmica (Indaiatuba, São Paulo, Brasil). Água deionizada foi obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil). Reagente de Folin & Ciocalteu, 2,2-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), ácido gálico, catequina e ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros produtos químicos usados, como tricloreto de alumínio hexa-hidratado, hidróxido de sódio, carbonato de sódio anidro e nitrito de sódio foram de grau analítico ou superior.

2.2 Material Vegetal

As folhas de *C. blanchetianus* foram coletadas em novembro de 2022, no município de Aquidabã, interior do Estado de Sergipe, Brasil (coordenadas 10°17'45,2''S, 37°02'10,7''W). Exsicata da planta foi depositada no Herbário da UFS com número de registro 42844 (acesso CBA-01). Após coletadas, as folhas foram secas em estufa de circulação de ar forçado (Modelo MA 035, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 40 °C durante 48 h. Após a secagem, as folhas foram trituradas utilizando liquidificador (Electronic Pro 2 em 1, Britânia, Joinville, Brasil) e as partículas foram selecionadas em granulometria entre 35 e 60 mesh, com auxílio de tamis específico (Bertel, Caieiras, São Paulo, Brasil).

2.3 Obtenção dos extratos de *Croton blanchetianus* Baill.

Os extratos das folhas de *C. blanchetianus* foram obtidos a partir das técnicas de Extração Assistida por Ultrassom (EAU), infusão e decocção para estabelecer comparações.

2.3.1 Extração por infusão

Para a extração por infusão, a massa de 0,5 g de folhas de *C. blanchetianus* foi adicionada a um bquer de 20 mL, e deixadas imersas em 10 mL de água ultrapurificada, previamente aquecida com o auxílio de um micro-ondas, atingindo a temperatura inicial para infusão de 75 °C. A amostra permaneceu sob infusão durante o tempo de 10 minutos. A extração foi realizada em duplicata.

2.3.2 Extração por decocção

Para a extração por decocção, a massa de 1,0 g de folhas de *C. blanchetianus* foi transferida para Erlenmeyers de 50 mL e submetida a extração com 20 mL de água ultrapurificada previamente aquecida com o auxílio de um micro-ondas, e mantida sob uma chapa aquecedora até entrar em ebulição. O frasco permaneceu sob a placa aquecedora durante 2 minutos e mantido em repouso por 8 minutos, totalizando 10 minutos de extração. A extração foi realizada em duplicata.

2.3.3 Extração por ultrassom e planejamento Box-Behnken

Para determinar o efeito da concentração de etanol, da relação solvente para sólido e do tempo de extração no teor de compostos fenólicos dos extratos obtidos foi realizado um planejamento experimental Box-Behnken [15]. Primeiramente, a massa de 0,5 g das folhas de *C. blanchetianus*

foi transferido para um Erlenmeyer de 50 mL e submetidas às condições de extração estabelecidas na Tabela 1. Três réplicas no ponto central foram utilizadas para a estimativa do erro experimental e os experimentos foram realizados de forma aleatória. O frasco de Erlenmeyer foi posicionado no centro do banho ultrassônico (Elmasonic P 60H, Alemanha) e a extração realizada em uma frequência de 37 kHz e temperatura de 30 ± 1 °C. A temperatura e o tempo de extração foram continuamente monitorados através do painel do equipamento. Para manter a temperatura do banho constante (± 1 °C), quando necessário, pequenos volumes de água destilada foram retirados do banho e substituídos por volumes iguais de água destilada gelada.

Tabela 1: Planejamento Box-Behnken contendo as variáveis independentes avaliadas e os resultados de TFT dos extratos obtidos por EAU a partir das folhas de Croton blanchetianus. As variáveis codificadas estão nos níveis baixo (-1), intermediário (0) e alto (1).

Ensaio	Variáveis			Resposta
	Concentração de etanol (X ₁ , %)	Relação solvente para sólido (X ₂ , mL/g)	Tempo (X ₃ , min)	TFT (Y, mg EAG/g ms)
1	0 (-1)	20 (-1)	17,5 (0)	77,17
2	80 (1)	20 (-1)	17,5 (0)	114,21
3	0 (-1)	100 (1)	17,5 (0)	103,12
4	80 (1)	100 (1)	17,5 (0)	98,43
5	0 (-1)	60 (0)	5,0 (-1)	107,96
6	80 (1)	60 (0)	5,0 (-1)	79,72
7	0 (-1)	60 (0)	30,0 (1)	94,44
8	80 (1)	60 (0)	30,0 (1)	107,48
9	40 (0)	20 (-1)	5,0 (-1)	117,01
10	40 (0)	100 (1)	5,0 (-1)	154,74
11	40 (0)	20 (-1)	30,0 (1)	150,80
12	40 (0)	100 (1)	30,0 (1)	160,25
13 ^c	40 (0)	60 (0)	17,5 (0)	157,35
14 ^c	40 (0)	60 (0)	17,5 (0)	166,28
15 ^c	40 (0)	60 (0)	17,5 (0)	165,43

^c ponto central

A relação entre as variáveis dependentes e independentes em cada planejamento foi explicada por uma função polinomial do segundo grau (Equação 1).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Equação 1}$$

onde Y corresponde a variável resposta medida; X_i e X_j (n entre 1 e 3) correspondem às variáveis independentes avaliadas em cada planejamento; β_0 é uma constante; β_i , β_{ii} , β_{ij} são os coeficientes de regressão do modelo: β_i para os termos lineares; β_{ii} para os termos quadráticos; e β_{ij} para os termos de interação.

Para os cálculos utilizados na determinação das condições ótimas de extração por EAU, considerando a maximização do TFT das folhas da espécie estudada, foi adotada a seguinte consideração: todas as variáveis possuem igual importância, ou seja, mesmo fator de peso e impacto [16]. Para a validação das condições de extração otimizada, foram realizadas extrações em triplicata por EAU, empregando as condições ótimas previstas por meio do planejamento BBD.

2.4 Tratamentos dos extratos e rendimento de extração

Após a extração, todos os extratos foram filtrados em papel de filtro, sob pressão reduzida. Em seguida, os extratos hidroetanólicos foram evaporados a 45 °C, sob pressão reduzida, para remoção do solvente orgânico. Subsequentemente, os extratos aquosos e hidroetanólicos resultantes da evaporação foram congelados a –80 °C em ultrafreezer (Liotop UFR30, Liobras, São Carlos, São Paulo, Brasil) e liofilizados a –58 °C e pressão abaixo de 100 µHg por tempos variáveis de 32 a 72h (Liotop L101, Liobras, São Carlos, São Paulo, Brasil). Os extratos brutos foram colocados em frascos de vidro e armazenados em freezer em temperatura abaixo de –10 °C e protegidos da luz.

O rendimento de cada extrato foi calculado de acordo com a Equação 2:

$$\text{Rendimento (\%, m/m)} = \frac{me}{ms} \times 100\% \quad \text{Equação 2}$$

onde, me é a massa do extrato (g) e ms é a massa de material seco (g).

Os extratos foram dissolvidos no solvente extrator correspondente, na concentração de 0,5 mg/mL e, então, centrifugados (Eppendorf MiniSpin, BioResearch, São Paulo, Brasil) a 13.400 rpm por 5 min antes dos ensaios fitoquímicos e antioxidante.

2.5 Teor de compostos fenólicos totais (TFT)

Os valores de TFT dos extratos foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com a metodologia descrita por Jesus et al. (2024) [15]. Primeiramente, uma alíquota de 25 µL do sobrenadante de cada extrato foi misturada com 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (10% v/v, em água) em uma microplaca de 96 poços. Após 5 min, um volume de 100 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃, 7,5% p/v) foi adicionado à mistura. A microplaca foi mantida em temperatura ambiente (25 ± 1 °C) por 1 h, protegida da luz, e a absorbância da mistura foi medida a 765 nm usando um leitor de microplacas (Synergy H1, BioTek). Os valores de TFT foram expressos como mg de equivalente de ácido gálico por grama de massa seca de planta (mg EAG/g ms, Equação 3), determinados a partir de uma curva calibração (0-300 mg/L, $y = 0,0052x + 0,1057$, $R^2 = 0,9923$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

$$\text{TFT (mg EAG/g ms)} = \frac{\text{EAG} \times \text{REND}}{\text{CE} \times 100\%} \quad \text{Equação 3}$$

onde, EAG é o equivalente de ácido gálico (mg/L) obtido a partir da curva de calibração, CE é a concentração do extrato (g/L) e REND é o rendimento de cada extrato (%).

2.6 Teor de flavonoides totais (TFLT)

Os valores de TFLT dos extratos foram determinados pela reação de complexação usando tricloreto de alumínio hexa-hidrato (AlCl₃.6H₂O) de acordo com a metodologia descrita por Jesus et al. (2024) [15]. Uma alíquota de 25 µL do sobrenadante de cada extrato foi misturada com 25 µL de uma solução aquosa de NaNO₂ (5% p/v), em uma microplaca de 96 poços, e deixada em repouso por 5 min. Um volume de 50 µL de uma solução aquosa de AlCl₃.6H₂O (10% p/v) foi adicionado e a mistura foi deixada em repouso por 5 min. Um volume de 200 µL de solução aquosa de NaOH (5% p/v) foi adicionado a cada poço da microplaca contendo a mistura de reação, seguido de incubação por 20 min em temperatura ambiente (25 ± 1 °C) e proteção da luz. A absorbância foi então medida a 510 nm usando um leitor de microplacas. Os valores de TFLT foram expressos como mg de equivalente de catequina por grama de massa seca de planta

(mg EC/g ms, Equação 4), determinados a partir de uma curva calibração (0-300 mg/L, $y = 0,0019x + 0,0528$, $R^2 = 0,9975$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

$$TFLT (mg EC/g ms) = \frac{EC \times REND}{CE \times 100\%} \quad \text{Equação 4}$$

onde, EC é o equivalente de catequina (mg/L) obtido a partir da curva de calibração, CE é a concentração do extrato (g/L) e REND é o rendimento de cada extrato (%).

2.7 Atividade antioxidante

A atividade de eliminação de radicais DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Jesus et al. (2024) [15]. Primeiramente, uma alíquota de 25 μ L do sobrenadante de cada extrato foi misturada com 150 μ L de solução DPPH (400 μ mol/L) em uma microplaca de 96 poços. Após incubação em temperatura ambiente (25 ± 1 °C) por 30 min, protegida da luz, a absorbância de cada amostra foi medida a 517 nm, usando um leitor de microplacas. A capacidade antioxidante de cada extrato foi expressa como micromol de equivalente Trolox por grama de peso seco de planta (μ mol ET/g ms, Equação 5), usando uma curva calibração (0-700 μ mol/L, $y = -0,0019x + 1,7464$, $R^2 = 0,9977$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

$$DPPH (\mu mol ET/g ms) = \frac{ET \times REND}{CE \times 100\%} \quad \text{Equação 5}$$

onde, ET é o equivalente Trolox (μ mol/L) obtido a partir da curva de calibração, CE é a concentração do extrato (g/L) e REND é o rendimento de cada extrato (%).

2.8 Análises cromatográficas por CLAE-DAD

As análises dos perfis químicos dos extratos de *C. blanchetianus* foram realizadas em um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu (Quioto, Japão) modelo Prominence composto por: módulo de comunicação CBM-20A, degaseificador DGU-20A3, sistema binário de bombas LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, detector espectrofotométrico com arranjo de diodos SPD-M20A, forno de colunas CTO-20A. O *software LC Solution* foi utilizado para a aquisição e tratamento dos dados.

Todos os extratos analisados foram preparados na concentração de 5 mg/mL. Os extratos de EAU foram dissolvidos em uma solução de metanol 50% em água. Os extratos de infusão e decocção foram dissolvidos em água ultrapura. Na sequência, cada extrato solubilizado foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 min e transferido para o *vial* de análise.

A separação cromatográfica foi realizada usando fase móvel constituída por uma mistura binária de metanol (B) e uma solução aquosa de ácido fórmico (HCOOH) a 0,5% (v/v) (A) na vazão de 0,8 mL/min, empregando-se o seguinte gradiente de eluição: 5-100% de B em 60 min; isocrático em 100% de B durante 5 min; retornando para a condição inicial variando-se de 100 a 5% de B em 5 min. O tempo de condicionamento da coluna entre as análises foi de 30 min mantendo 5% de B. Foi utilizada uma coluna analítica Kinetex C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 μ m, 100 Å, Phenomenex) acoplada a uma coluna de guarda de mesma fase estacionária, ambas a uma temperatura de 45 °C, com volume de injeção da amostra de 15 μ L. Os comprimentos de onda utilizados para a detecção dos compostos químicos foram 320 nm e 380 nm.

2.9 Análises estatísticas

A análise de regressão dos dados experimentais foi realizada usando o software Minitab 19[®] (Minitab, LLC., State College, PA, USA) versão teste. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para verificar a significância estatística das variáveis independentes analisadas

($p < 0,05$). Os parâmetros estatísticos coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajustado}) e teste de Fisher (teste F) foram usados para verificar a adequação dos modelos propostos aos dados obtidos. Para as análises de média, desvio-padrão e confecção dos gráficos, foi utilizado o software Excel. Para as análises de diferenças estatísticas entre os resultados de TFT, TFLT e antioxidantes das amostras, foi utilizado o software PAST, utilizando os testes estatísticos ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Planejamento Box-Behnken

Nesse trabalho foi utilizado um planejamento Box-Behnken (Tabela 1) para se otimizar a extração de compostos fenólicos das folhas de *C. blanchetianus*, avaliando os efeitos das variáveis concentração de etanol, a relação solvente para sólido e o tempo, uma vez que elas podem afetar significativamente a recuperação de compostos fenólicos por ultrassom [15, 17, 18].

Pode-se observar através da Tabela 1 que os valores de TFT dos extratos variam de acordo com as condições de extração (entre 77,17 e 166,28 mg EAG/g ms), o que sugere influência de alguma variável nessa resposta. No entanto, para avaliar qual variável apresenta influência significativa nos resultados recorre-se ao gráfico de Pareto (Figura 1), o qual apresenta os termos significativos ($p < 0,05$) referentes às variáveis estudadas e efeito relativo (positivo ou negativo) de cada um no TFT.

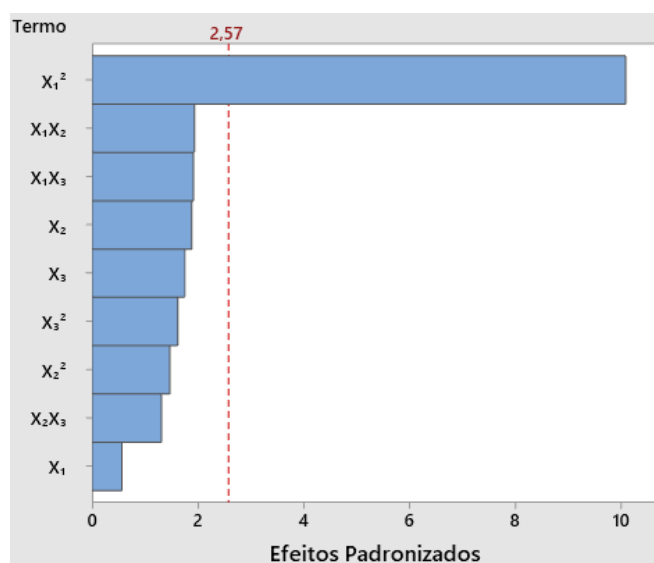


Figura 1: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis concentração de etanol (X_1), relação solvente para sólido (X_2) e tempo de extração (X_3) sobre a resposta do TFT das folhas de *Croton blanchetianus*.

Como pode ser observado na Figura 1, apenas o termo quadrático (X_1^2), referente à variável concentração de etanol, apresentou efeito significativo negativo. Os demais termos não foram significativos. Um efeito quadrático negativo (como observado para X_1^2) indica um ponto de máximo de recuperação dos compostos extraídos com a modificação dessa variável [17, 19]. Esses resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que é constatado que o uso de misturas de solventes polares (etanol:água e metanol:água) aumenta a extração dos compostos fenólicos, se comparado ao uso desses solventes puros [18].

As Figuras 2A e 2B ilustram o efeito das variáveis independentes no TFT por meio de um gráfico de superfície de resposta tridimensional analisando-se duas variáveis de cada vez.

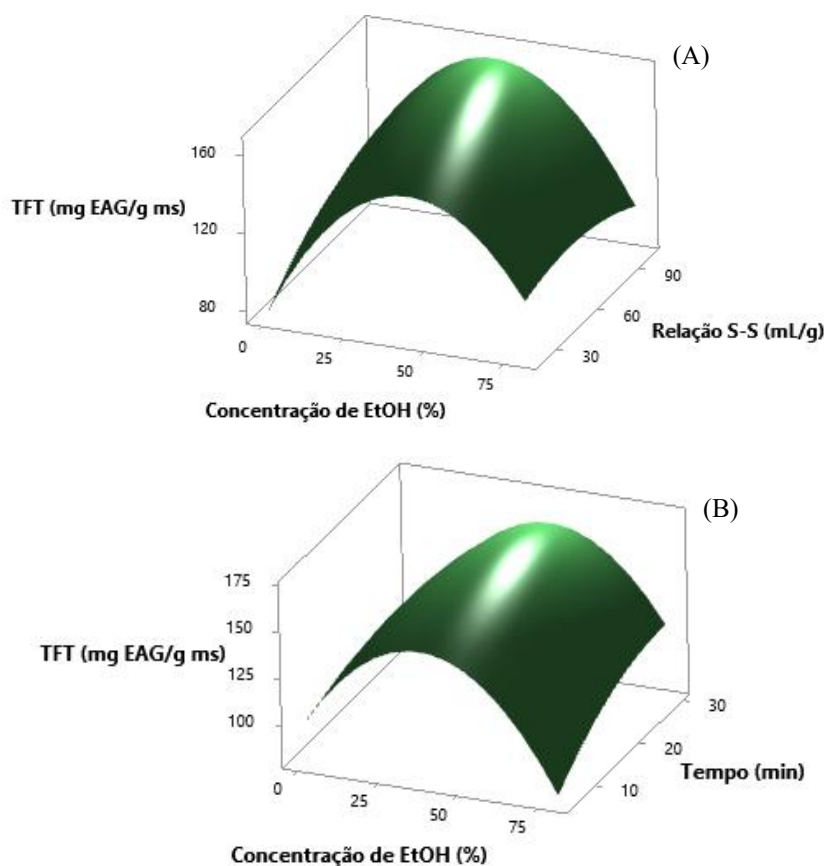


Figura 2: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da concentração de etanol, da relação solvente para sólido e do tempo de extração no valor de TFT dos extratos das folhas de *Croton blanchetianus* obtidos por EAU: (a) concentração de etanol versus relação solvente para sólido (Relação S-S), (b) concentração de etanol versus tempo de extração.

Nas Figuras 2A e 2B, é possível evidenciar o efeito quadrático significativo da concentração de etanol no TFT dos extratos de *C. blanchetianus*. O TFT aumenta até um valor de máximo com o aumento da concentração de etanol até próximo de 40% e diminui com o aumento posterior dessa variável até 80%. Esses resultados podem ser atribuídos ao fato de que a eficiência de extração depende fortemente da semelhança de polaridade entre o solvente de extração e os compostos a serem extraídos, o que se relaciona com o grau de solubilidade desses compostos químicos no solvente. Assim, considerando o princípio da solubilidade de que “semelhante dissolve semelhante” os compostos fenólicos extraídos têm polaridade semelhante àquela da mistura de 40% de etanol em água. Redução do TFT após 40% de etanol pode estar relacionado ao fato de que uma alta concentração de etanol pode causar desnaturação de proteínas, o que pode impedir a dissolução dos compostos fenólicos presentes na matriz vegetal e influenciar, portanto, o processo de transferência de massa [17, 20].

No estudo realizado por Brahmi et al. (2022) [21] para a recuperação de compostos fenólicos a partir das flores de *Opuntia ficus-indica* por EAU, o maior valor de TFT foi obtido empregando concentração de etanol de 40%. Tendência semelhante foi observada por Luo et al. (2018) [22] na recuperação de compostos fenólicos a partir de *Sorghum bicolor* por EAU; com o maior valor de TFT sendo obtido com uma solução de etanol a 50%. O efeito do solvente na extração de compostos fenólicos a partir das folhas de *Lantana camara* foi observado por Jesus et al. (2024) [15]. Nesse caso, o valor de TFT dos extratos obtidos aumentou com o aumento da concentração de etanol em água de 10 até 30% e diminuiu com o aumento posterior da concentração desse solvente até 50%.

Na Tabela 2 estão mostrados os valores obtidos através da análise de variância (ANOVA) para a resposta estudada (TFT). Os termos que apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) estão

destacados com asterisco (*), o que corrobora os resultados observados no gráfico de Pareto (Figura 1).

Tabela 2: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático considerando a extração por ultrassom (EAU) proposta para o TFT. Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com um asterisco ().*

Fonte	TFT (mg EAG/g ms)			Valor F	Valor-P
	GL	SQ (Aj.)	MQ (Aj.)		
Modelo	9	13801,3	1533,5	13,19	0,006*
X ₁ (Concentração de etanol)	1	36,8	36,8	0,32	0,598
X ₂ (Relação Solvente para sólido)	1	411,1	411,1	3,54	0,119
X ₃ (Tempo de extração)	1	358,1	358,1	3,08	0,140
X ₁ X ₁	1	11804,1	11804,1	101,57	0,000*
X ₂ X ₂	1	251,0	251,0	2,16	0,202
X ₃ X ₃	1	304,2	304,2	2,62	0,167
X ₁ X ₂	1	435,0	435,0	3,74	0,111
X ₁ X ₃	1	425,9	425,9	3,66	0,114
X ₂ X ₃	1	200,0	200,0	1,72	0,247
Erro	5	581,1	116,2		
Falta de ajuste	3	532,5	177,5	7,30	0,123
Erro puro	2	48,6	24,3		
Total	14	14382,4			
R ²	95,96%				
R ² _{ajustado}	88,69%				

GL = Graus de liberdade, SQ = Soma dos quadrados, MQ = Média dos Quadrados, R² = Coeficiente de determinação, TFT = Teor de fenólicos totais, EAG = Equivalente de ácido gálico, ms = Material seco.

O modelo proposto foi considerado significativo, apresentando um alto valor de F (13,19) e baixo p -valor (0,006) (Tabela 2). O modelo apresentou bom ajuste às respostas observadas como evidenciado pelo alto valor do coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9596$), onde 95,96% da variação dos dados de rendimento de extração pode ser explicada pelo modelo proposto; pois quanto mais próximo de 1 for o valor de R^2 , melhor será o ajuste do modelo às respostas. Adicionalmente, o alto valor do coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{\text{ajustado}} = 0,8869$), próximo ao R^2 , confirma a grande significância do modelo obtido e o alto grau de correlação entre os valores experimentais e os preditos. Esses resultados indicam uma alta capacidade do modelo em prever a relação entre as variáveis independentes e dependentes (respostas) [17, 23]. Esses resultados indicam que o modelo estimado pode ser adequadamente utilizado para prever o TFT do extrato da espécie *C. blanchetianus* nas condições estudadas [17, 19, 22, 23].

Com base na análise de regressão, a relação entre as variáveis independentes e o TFT de extração pode ser descrita por uma equação polinomial quadrática (Equação 6).

$$TFT(Y) = 31,800 + 2,911X_1 + 1,306X_2 + 2,59X_3 - 0,006X_1X_2 + 0,021X_1X_3 - 0,014X_2X_3 - 0,035X_1^2 - 0,005X_2^2 - 0,058X_3^2 \quad \text{Equação 6}$$

onde X₁, X₂ e X₃ são as variáveis codificadas concentração de etanol, relação solvente para sólido e tempo de extração, respectivamente.

Segundo o modelo matemático, as condições ótimas de extração por EAU determinadas foram 40,40% de etanol, relação solvente para sólido de 72,54 mL/g e tempo de 20,67 min. O TFT ótimo previsto nessas condições foi de 165,02 mg EAG/g ms.

3.2 Validação das condições otimizadas simultaneamente por EAU

Para realizar a validação das condições previstas pelo planejamento Box-Behnken foram realizadas 3 extrações utilizando os valores ótimos determinados estatisticamente (concentração de etanol de 40,40%, relação solvente para sólido de 72,52 mL/g e tempo de 20,67 min). Na Tabela 3, é possível verificar os valores preditos e os valores experimentais obtidos.

Tabela 3: Comparação entre os valores preditos estatisticamente de TFT e os valores reais obtidos por experimentos de extração assistida por ultrassom com as folhas de *Croton blanchetianus*.

Resposta	Valor Experimental	Valor Predito	Desvio Padrão Relativo (%)
TFT (mg EAG/g ms)	154,99 ± 3,96	165,02	4,44

Os valores de TFT experimentais e preditos mostrados na Tabela 3 foram muito próximos, apresentando baixo desvio relativo (4,44%). Esses resultados indicam que o modelo explica adequadamente o processo de extração e possui alta capacidade de prever o TFT dos extratos por EAU, além de prever a melhor concentração de etanol, o melhor tempo de extração e a melhor relação solvente para sólido considerando os intervalos avaliados para cada variável [16, 24].

3.3 Comparação dos resultados fitoquímicos e antioxidantes dos diferentes extratos de *C. blanchetianus*

Pelos ensaios realizados com os extratos obtidos pelas diferentes técnicas extrativas, foi possível avaliar as diferenças entre as amostras em termos de resultados fitoquímicos e antioxidantes. Na Figura 3 estão mostrados os resultados de rendimento, TFT e TFLT apresentados pelos diferentes extratos de *C. blanchetianus*.

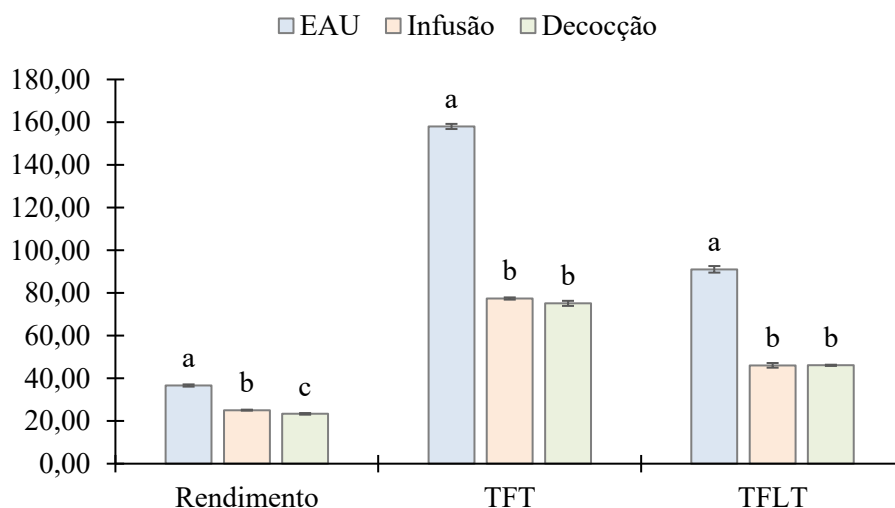


Figura 3: Comparação entre o Rendimento (%), TFT (mg EAG/g ms) e TFLT (mg EC/g ms) dos extratos obtidos por Extração Assistida por Ultrassom (EAU), infusão (INF) e decocção (DEC) a partir das folhas de *Croton blanchetianus*. Letras diferentes nas colunas de cada série de dados significam que há diferença significativa entre os resultados segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Pela análise da Figura 3, percebe-se uma superioridade do extrato de EAU em comparação aos demais com relação aos valores de rendimento de extração, TFT e TFLT. A eficácia do método de ultrassom é atribuída, principalmente, ao fenômeno da cavitação acústica resultante da propagação das ondas ultrassônicas no solvente. Nesse fenômeno, as ondas ultrassônicas geram

bolhas no solvente que crescem durante os momentos de rarefação e compressão das ondas sonoras até colapsarem. Ao colapsar, as bolhas implodem emitindo jatos de alta velocidade, pressão e temperatura que causam quebra de partículas e erosão de membranas, o que favorece o rompimento da parede celular vegetal e aumenta a transferência de massa durante o processo de extração, potencializando a extração de polifenóis, compostos aromáticos, antocianinas, óleos e polissacarídeos [13, 14].

Diversos estudos mostram que a EAU apresenta melhores resultados de recuperação em comparação a diferentes técnicas de extração [15, 17, 25-27]. O extrato de EAU das folhas de *Piper betle* (empregando as condições otimizadas de extração) resultou em maiores valores de rendimento de extração, TFT e TFLT em comparação ao da maceração [17]. O extrato obtido por EAU a partir de *Punica granatum* apresentou maior TFT em comparação aos extratos obtidos por decocção e maceração a partir dessa espécie [27]. Em um trabalho realizado por Jesus et al. (2024) [15], o extrato obtido a partir de *Lantana camara* por EAU apresentou maior TFT e TFLT em comparação ao extrato obtido por infusão e decocção.

Os efeitos das técnicas de ultrassom, infusão e decocção na atividade antioxidante dos extratos e estão mostrados na Figura 4.

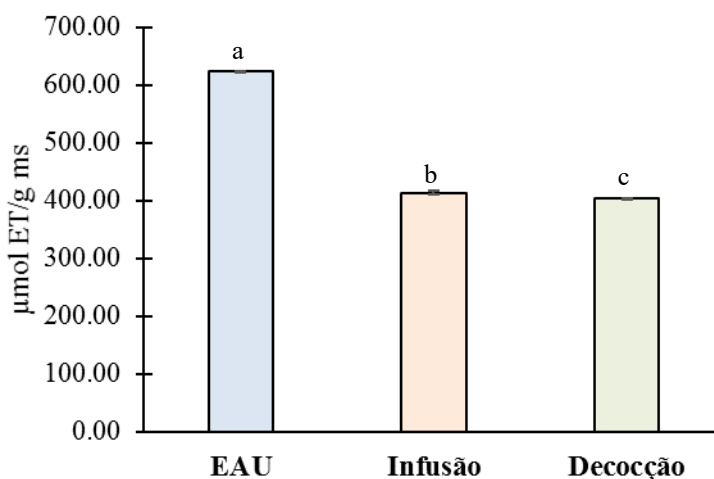


Figura 4: Comparação entre os resultados de atividade antioxidante dos extratos das folhas de *Croton blanchetianus* obtidos por EAU, infusão e decocção. As letras sobrescritas diferentes indicam que há diferença estatística entre as médias segundo a ANOVA e teste Tukey ($p < 0,05$). ET: equivalente de Trolox.

Na Figura 4 observa-se que o extrato de *C. blanchetianus* obtido por EAU apresentou maior atividade antioxidante em comparação aos extratos de infusão e decocção. Esses dados corroboram os resultados de TFT e TFLT (Figura 3) desses extratos, onde percebe-se uma correlação direta com os valores das atividades antioxidantes observadas [15].

Esses resultados de EAU em comparação a essas técnicas convencionais podem ser atribuídos, principalmente, ao efeito de cavitação acústica. Este efeito favorece a destruição da parede celular vegetal, o que possibilita o aumento na transferência de massa do processo de extração [19, 22].

3.4 Perfil cromatográfico dos extratos de *C. blanchetianus*

A partir da obtenção dos extratos originados de diferentes métodos extrativos, foram realizadas análises cromatográficas para verificação do perfil químico de cada extrato. Esse perfil pode ser visualizado na Figura 5.

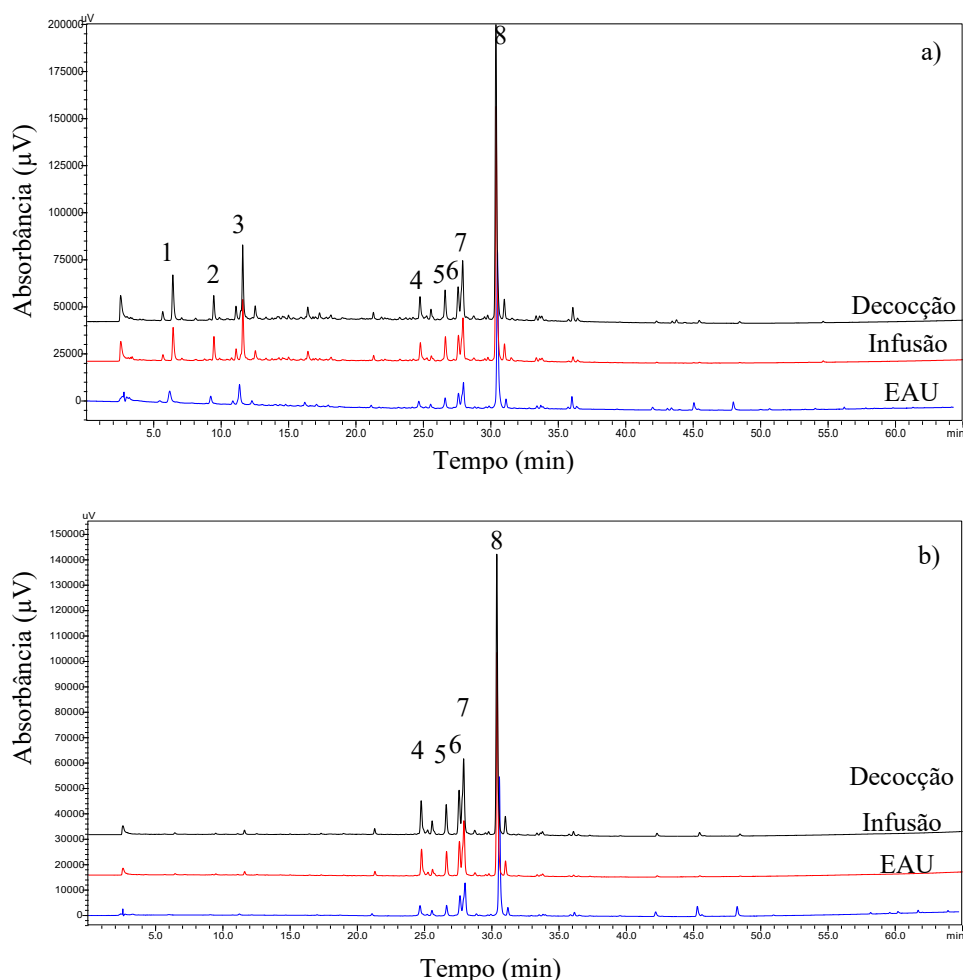


Figura 5: Perfis cromatográficos dos extratos das folhas de *Croton blanchetianus* (a) $\lambda=320$ nm e b) $\lambda=380$ nm preparados por diferentes métodos de extração: ultrassom (EAU), infusão e decocção.

Através dos cromatogramas da Figura 5 [a] $\lambda=320$ nm e b) $\lambda=380$ nm] pode-se observar que não houve variação química qualitativa significativa entre os extratos obtidos pelas diferentes técnicas extrativas utilizadas, considerando o método de detecção utilizado. As diferenças, mesmo que aparentemente pouco significativa, provavelmente estão relacionadas às diferenças entre os métodos de extração, como observado nos resultados de TFT e TFLT entre os extratos.

Com base na resolução dos picos cromatográficos, foram selecionados alguns deles (numerados de 1 a 8) para sugerir a identificação das suas classes químicas de acordo como seus respectivos espectros no Ultravioleta (UV). Os espectros obtidos estão mostrados na Figura 6.

Como pode ser observado na Figura 6, os espectros dos picos 1 ($\lambda_{\text{max}} = 326$ nm), 2 ($\lambda_{\text{max}} = 326$ nm) e 3 ($\lambda_{\text{max}} = 241$ nm, 327 nm) apresentam espectros no UV condizentes com fenilpropanoides contendo um sistema do tipo carbonílico α,β -insaturado [28-30]. Os picos 4 ($\lambda_{\text{max}} = 262, 355$ nm), 5 ($\lambda_{\text{max}} = 256, 351$ nm), 6 ($\lambda_{\text{max}} = 256, 355$ nm), 7 ($\lambda_{\text{max}} = 256, 354$ nm) e 8 ($\lambda_{\text{max}} = 256, 350$ nm), apresentam espectros no UV condizentes com os de flavonoides [28-30]. Esses resultados estão de acordo com aqueles relatados na literatura por de Oliveira et al. (2022) [31], que mostrou a presença dessas classes de compostos nos extratos obtidos de *C. blanchetianus*.

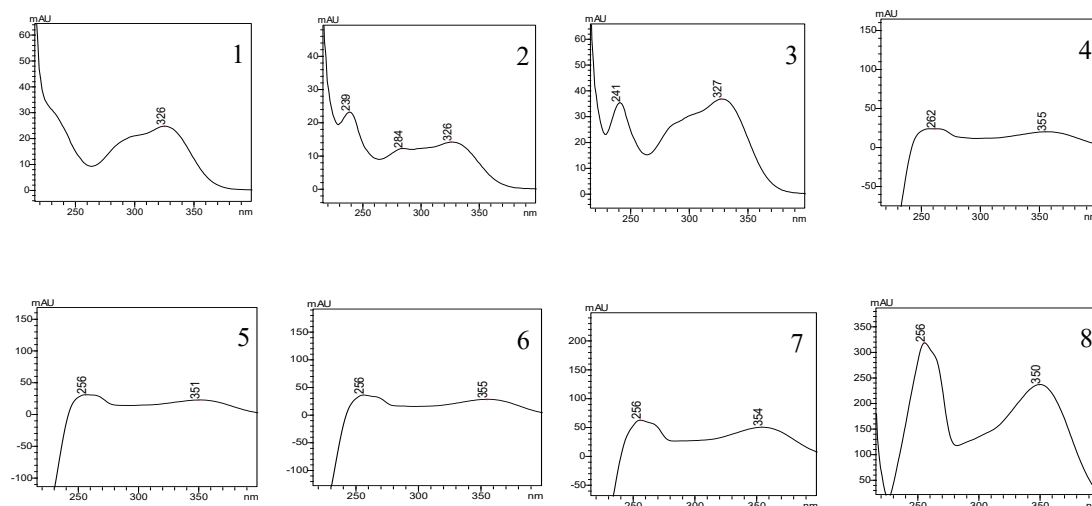


Figura 6: Espectros de absorção no UV (210 a 400 nm) dos compostos químicos presentes no extrato das folhas de *Croton blanchetianus*, os quais estão numerados no cromatograma da Figura 4.

Em geral, com base nas análises por CLAE-DAD dos extratos de *C. blanchetianus* realizadas neste trabalho, foi possível avaliar quais as classes de compostos químicos estão presentes nas preparações dessa espécie. Entretanto, análises adicionais por espectrometria de massas são necessárias para se conhecer a identidade dos compostos químicos que são responsáveis pelas atividades antioxidantes dessa espécie.

A semelhança dos perfis cromatográficos entre os extratos de *C. blanchetianus* (Figura 5) mostra que os mesmos compostos químicos estão presentes nos diferentes extratos, sendo necessários estudos adicionais para quantificá-los.

4. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível observar que a concentração de etanol foi a variável que mais influenciou o processo de extração dos compostos fenólicos. As condições ótimas obtidas foram 40,40% de etanol, relação solvente para sólido de 72,53 mL/g e tempo de 20,6 min, resultando em um valor de TFT experimental de $154,99 \pm 3,96$ mg EAG/g ms.

O extrato obtido por EAU, nas condições ótimas de extração, apresentou maiores valores de rendimento de extração, teor de fenólicos totais (TFT), teor de flavonoides totais (TFLT) e atividade antioxidante em comparação aos extratos obtidos por infusão e decocção. Além disso, a análise dos perfis cromatográficos permitiu verificar a presença de diferentes classes de compostos fenólicos nos diferentes extratos: ácidos fenólicos ou fenilpropanoides e flavonoides.

Desta forma, pode-se sugerir com mais segurança que o uso das técnicas EAU para a extração de compostos fenólicos antioxidantes a partir das folhas de *C. blanchetianus* é uma alternativa mais eficiente em relação às técnicas de infusão e decocção. Adicionalmente, os resultados obtidos sugerem que essa espécie pode ser uma importante fonte de compostos fenólicos antioxidantes a ser explorada tendo em vista seu potencial biológico e econômico.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de Sergipe, pelo financiamento dos projetos que fundamentaram esse trabalho. Além disso, os autores gostariam de agradecer ao Centro de Laboratórios Químicos Multiusuários (CLQM) da Universidade Federal de Sergipe pelo apoio às análises realizadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Xu WH, Liu WY, Liang Q. Chemical constituents from *Croton* species and their biological activities. *Molecules*. 2018 Sep 12;23(9):2333. doi: 10.3390/molecules23092333
2. Dutra RC, Campos MM, Santos AR, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res*. 2016 Oct;112:4-29. doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.021
3. Oliani J, Ferreira MJP, Salatino A, Salatino MLF. Leaf flavonoids from *Croton urucurana* and *C. floribundus* (Euphorbiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 2021 Feb;94:104217. doi: 10.1016/j.bse.2020.104217
4. Salatino A, Salatino MLF, Negri G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J Braz Chem Soc*. 2007;18(1):11-33. doi: 10.1590/S0103-50532007000100002
5. Cabrera SP, Camara CA, Silva TMS. Chemical studies of *Croton heliotropiifolius* and *Croton blanchetianus* flowers visited by bees. *Chem Nat Compd*. 2021 May;57(3):525-7. doi: 10.1007/s10600-021-03403-0
6. Melo GFDA, Costa ACVD, Garino Junior F, Medeiros RS, Madruga MS, Queiroga Neto V. The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to *Croton blanchetianus* Baill essential oil. *Braz J Microbiol*. 2013 Dec;44(4):1189-94. doi: 10.1590/S1517-83822014005000009
7. de Figueiredo MJ, Grisi CVB, Santiago ÂM, Vieira EA, Cordeiro AMTM, Vilela AF, et al. Characterization and application of *Croton blanchetianus* Baill extract for lamb ribs preservation. *Food Chem*. 2022 Mar 30;373(Pt A):131404. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131404
8. de Oliveira AM, Widmer R, do Nascimento MF, Costa WK, Paiva PMG, Napoleão TH. Flavonoid-rich fraction from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) leaves exerts peripheral and central analgesic effects by acting via the opioid and cholinergic systems. *Chem Biodivers*. 2022 Mar;19(3):e202100853. doi: 10.1002/cbdv.202100853
9. Dantas TS, Oliveira AM, Ferreira MRA, Soares LAL. Therapeutic potential of *Croton blanchetianus* for the treatment of gastric ulcers: A brief review. *Biointerface Res Appl Chem*. 2021 Dec;12(6):8219-30. doi: 10.33263/briac126.82198230
10. de Carvalho APA, Conte-Junior CA. Health benefits of phytochemicals from Brazilian native foods and plants: Antioxidant, antimicrobial, anti-cancer, and risk factors of metabolic/endocrine disorders control. *Trends Food Sci. Technol*. 2021 May;111:534-48. doi: 10.1016/j.tifs.2021.03.006
11. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015 Jun 5;97:55-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040
12. Carreira-Casais A, Otero P, Garcia-Perez P, Garcia-Oliveira P, Pereira AG, Carpena M, et al. Benefits and drawbacks of ultrasound-assisted extraction for the recovery of bioactive compounds from marine Algae. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Aug;18(17):9153. doi: 10.3390/ijerph18179153
13. Shirsath SR, Sonawane SH, Gogate PR. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chem Eng Process: Process Intensif*. 2012 Mar;53:10-23. doi: 10.1016/j.cep.2012.01.003
14. de Jesus RA, da Silva WR, Wisniewski Jr A, de Andrade Nascimento LF, Blank AF, de Souza DA, et al. Microwave and ultrasound extraction of antioxidant phenolic compounds from *Lantana camara* Linn. leaves: Optimization, comparative study, and FT-Orbitrap MS analysis. *Phytochem Anal*. 2024 Jun;35(4):889-902. doi: 10.1002/pca.3335
15. Nabet N, Gilbert-López B, Madani K, Herrero M, Ibáñez E, Mendiola JA. Optimization of microwave-assisted extraction recovery of bioactive compounds from *Origanum glandulosum* and *Thymus fontanesii*. *Ind Crops Prod*. 2019 Mar;129:395-404. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.12.032
16. Ali A, Lim XY, Chong CH, Mah SH, Chua BL. Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from *Piper betle* using response surface methodology. *LWT*. 2018 Mar;89:681-8. doi: 10.1016/j.lwt.2017.11.033
17. Ozdemir M, Gungor V, Melikoglu M, Aydiner C. Solvent selection and effect of extraction conditions on ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from galangal (*Alpinia officinarum*). *J Appl Res Med Aromat Plants*. 2024 Feb;38:100525. doi: 10.1016/j.jarmp.2023.100525
18. Xu DP, Zheng J, Zhou Y, Li Y, Li S, Li HB. Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. *Food Chem*. 2017 Feb;217:552-559. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.013
19. Dahmoune F, Nayak B, Moussi K, Remini H, Madani K. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem*. 2015 Jan;166:585-95. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.066

20. Brahmi F, Blando F, Sellami R, Mehdi S, De Bellis L, Negro C, et al. Optimization of the conditions for ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Opuntia ficus-indica* [L.] Mill. flowers and comparison with conventional procedures. *Ind Crops Prod.* 2022 Sep;184:114977. doi: 10.1016/j.indcrop.2022.114977
21. Luo X, Cui J, Zhang H, Duan Y, Zhang D, Cai M, et al. Ultrasound assisted extraction of polyphenolic compounds from red sorghum (*Sorghum bicolor* L.) bran and their biological activities and polyphenolic compositions. *Ind Crops Prod.* 2018 Feb;112:296-304. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.12.019
22. Alara OR, Abdurahman NH, Ali HA, Zain NM. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Carica papaya* leaves: An optimization study and LC-QTOF-MS analysis. *Future Foods.* 2021 Jun;3:100035. doi: 10.1016/j.fufo.2021.100035
23. Zoubi YE, Fadil M, Boustia D, Lalami AEO, Lachkar M, Farah A. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Moroccan *Lavandula stoechas* L.: Optimization using response surface methodology. *J Chem.* 2021 Jan 12;2021:1-11. doi: 10.1155/2021/8830902
24. Santos LG, Martins VG. Optimization of the green extraction of polyphenols from the edible flower *Clitoria ternatea* by high-power ultrasound: A comparative study with conventional extraction techniques. *J Appl Res Med Aromat Plants.* 2023 Apr;34:100458. doi: 10.1016/j.jarmap.2023.100458
25. Yusoff IM, Mat Taher Z, Rahmat Z, Chua LS. A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Res Int.* 2022 Jul;157:111268. doi: 10.1016/j.foodres.2022.111268
26. Castro-López C, Ventura-Sobrevilla JM, González-Hernández MD, Rojas R, Ascacio-Valdés JA, Aguilar CN, et al. Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chem.* 2017 Dec 15;237:1139-48. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.032
27. Campos MDG, Markham KR. Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: flavones, flavonols and phenolic acids. *Imprensa da Universidade de Coimbra*; 2007. doi: 10.14195/978-989-26-0480-0
28. Kachmar MR, Oliveira AP, Valentão P, Gil-Izquierdo A, Domínguez-Perles R, Ouahbi A, et al. HPLC-DAD-ESI/MSn phenolic profile and in vitro biological potential of *Centaurium erythraea* Rafn aqueous extract. *Food Chem.* 2019 Apr;278:424-33. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.11.082
29. Moussi K, Nayak B, Perkins LB, Dahmoune F, Madani K, Chibane M. HPLC-DAD profile of phenolic compounds and antioxidant activity of leaves extract of *Rhamnus alaternus* L. *Ind Crops Prod.* 2015 Nov;74:858-66. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.06.015
30. de Oliveira AM, de Freitas AFS, Costa WK, Machado JCB, Bezerra ICF, Ferreira MRA, et al. Flavonoid-rich fraction of *Croton blanchetianus* Baill. (Euphorbiaceae) leaves: Chemical profile, acute and subacute toxicities, genotoxicity and antioxidant potential. *S Afr J Bot.* 2022 Jan;144:238-49. doi: 10.1016/j.sajb.2021.08.040