

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOLOS E QUALIDADE DE  
ECOSSISTEMAS

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM  
*Croton heliotropiifolius* Kunth E APLICAÇÃO DO EXTRATO NO  
CRESCIMENTO DO FEIJÃO-CAUPI**

**CHEILA BONATI DO CARMO DE SOUSA**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**ABRIL - 2020**

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM  
*Croton heliotropiifolius* Kunth E APLICAÇÃO DO EXTRATO NO  
CRESCIMENTO DO FEIJÃO-CAUPI**

**CHEILA BONATI DO CARMO DE SOUSA**

Tecnóloga em Agroecologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2017

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Solos e Qualidade de Ecossistemas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Solos e Qualidade de Ecossistemas.

**Orientador: Prof. Dr. Fábio De Souza Dias**

**Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
ABRIL, 2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S725o

Sousa, Cheila Bonati do Carmo de

Otimização da extração de compostos fenólicos em *Croton heliotropiifolius* Kunth e aplicação do extrato no crescimento do feijão-caupi / Cheila Bonati do Carmo de Sousa. \_ Cruz das Almas, BA, 2020.

68.; il.

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Souza Dias

Co-Orientador: Prof. Dr. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Solos e Qualidade de Ecossistemas

1. Plantas Medicinais. 2. Cultivo de Feijão - Caupi 3. Compostos Bioativos - Planta Medicinal. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 633.88

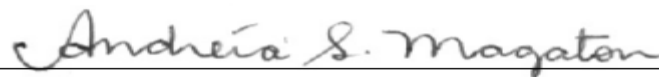
Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.  
Responsável pela Elaboração - Neubler Nilo Ribeiro da Cunha (*Bibliotecário - CRB5/1578*)  
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOLOS E QUALIDADE DE  
ECOSSISTEMAS

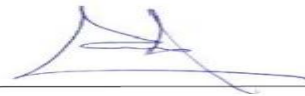
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE CHEILA  
BONATI DO CARMO DE SOUSA



Prof. Dr. Fábio de Souza Dias (Orientador)  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB



Profa. Dra. Andréia da Silva Magaton  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB



Profa. Dra. Franceli da Silva  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Solos e  
Qualidade de Ecossistemas em \_\_\_\_\_, conferindo o  
Grau de Mestre em Solos e Qualidade de Ecossistemas em  
\_\_\_\_\_.

A Deus, por todo seu amor e bondade sobre a minha vida. Ao meu marido e meu filho, por todo amor, compreensão e confiança que sempre me dispuseram.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus e Jesus Cristo por toda obra realizada em minha vida, pelo sustento nos momentos difíceis e por cada momento de felicidade que tenho vivido.

Ao meu marido, por todo amor, incentivo e apoio. Agradeço ainda por toda ajuda física no decorrer da realização deste trabalho.

Ao meu filho amado, por todo amor e carinho e, por ter me compreendido e apoiado sempre que foi preciso.

Aos meus pais e minha irmã, por todo amor, apoio e ajuda que me dispuseram.

A todos os familiares, pela torcida e carinho.

Ao meu orientador professor Fábio S. Dias, pelo acolhimento, apoio, confiança, compreensão e, por todo empenho e conhecimento transmitido para realização deste trabalho.

A minha coorientadora professora Rafaela S. A. Nóbrega, pela confiança, paciência, incentivo, dedicação e por todo conhecimento transmitido.

Aos amigos Cândice, Gilvanda, Gisele, Caliane, Andreza, Elisângela, Danilo, Fabrício e Maria, por toda ajuda e apoio durante a execução deste trabalho.

Aos professores, Anacleto, Ana Firmino e Carlos Dória, pelo auxílio.

A equipe do grupo LAIA e da Biologia do Solo, por toda ajuda e momentos descontraídos.

Aos técnicos de laboratório, funcionários da Fazenda Experimental da UFRB e do programa de Solos e Qualidade em Ecossistemas, por toda assistência.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Solos e Qualidade de Ecossistemas, por transferir o conhecimento.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que participaram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>PÁGINA</b>
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	<b>14</b>
 <b>CAPÍTULO 1</b>	
OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM FOLHAS DE <i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth.....	<b>23</b>
 <b>CAPÍTULO 2</b>	
GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E NODULAÇÃO DO FEIJÃO-CAUPI CULTIVADO COM EXTRATO DE <i>Croton heliotropiifolius</i> kunth .....	<b>48</b>
 <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

**Figura 1.** Estrutura de compostos fenólicos: Ácido vanílico (A); Ácido siríngico (B); Ácido clorogênico (C); Ácido gálico (D); Ácido *p*-cumárico (E); Ácido *trans*-cinâmico (F); Ácido cafeico (G); Ácido ferúlico (H).....15

**Figura 2.** Planta de *Croton heliotropiifolius*.....16

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.** Estrutura básica dos flavonoides (A). Exemplos de flavonoides: quercetina e kaempferol (B).....27

**Figura 2.** Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo de dois níveis ( $2^4$ ) na extração das folhas de *Croton heliotropiifolius*..... 33

**Figura 3.** Gráfico de superfície de resposta da otimização das variáveis que foram significativas na extração de flavonoides totais em folhas de *Croton heliotropiifolius*.....36

**Figura 4.** Estrutura básica do ácido elágico. ....40

### CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Plantas de feijão-caupi cultivadas em areia lavada autoclavada, com diferentes fontes de N e, doses de extrato de *C. heliotropiifolius*. (A) 0 mL de extrato; (B) 0,5 mL de extrato; (C) 1,0 mL de extrato; (D) 1,5 mL de extrato. (C/N): com nitrogênio; (M/N): metade de nitrogênio; (03-11B): estirpe inoculante para o feijão-caupi.....56

**Figura 2.** Plantas de feijão-caupi cultivadas em solo Latossolo Amarelo distrófico (Lad), com diferentes fontes de N e, doses de extrato (mL) de *C. heliotropiifolius*. (A) Sem N: (testemunha); (B) Com N mineral; (C) Estirpe 03-11B; (D) Estirpe UFLA 03-84; (E) Estirpe UFRB FA34C2-2; (F) Floração do feijão-caupi.....59



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** Planejamento fatorial completo de dois níveis ( $2^4$ ) na extração de flavonoides das folhas e *Croton heliotropiifolius*.....32
- Tabela 2.** Matriz Doehlert para as variáveis estatisticamente significativas.....35
- Tabela 3.** Respostas de rendimento para extração de compostos bioativos em espécies vegetais, com o emprego do ultrassom..... 39
- Tabela 4.** Teste de adição e recuperação em amostras de folhas de *Croton heliotropiifolius*.....40
- Tabela 5.** Quantificação dos compostos identificados no extrato otimizado de *Croton heliotropiifolius*.....41

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Desdobramento da interação para as variáveis: clorofila a (CLA), b (CLB) e total (CLT); matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST); matéria seca dos nódulos (MSN), percentagem de emergência (E%) e percentagem de velocidade emergência (%VE) das plantas de feijão-caupi cultivadas em areia lavada autoclavada, Cruz das Almas-BA, 2019.....57
- Tabela 2.** Desdobramento da interação para as variáveis: clorofila a (CLA), b (CLB) e total (CLT); matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST); número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (MSN) e número de folhas (NF) das plantas de feijão-caupi cultivadas em Latossolo Amarelo distrófico, Cruz das Almas-BA, 2019.....60

# OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM *Croton heliotropiifolius* Kunth E APLICAÇÃO DO EXTRATO NO CRESCIMENTO DO FEIJÃO-CAUPI

**Resumo:** O extrato de *Croton heliotropiifolius* é promissor para formulação de produtos naturais, que tenham a capacidade de inibir o crescimento de patógenos rizosférico que acometem a cultura do feijão-caupi. Contudo, a planta é beneficiada pela tecnologia da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Assim, é indispensável que, até mesmo o uso de produtos naturais formulados para inibição de patógenos, não afetem negativamente a nodulação e eficiência da simbiose entre a espécie e as bactérias diazotróficas. Este estudo está dividido em dois capítulos. Objetivou-se no primeiro capítulo determinar as melhores condições para extração de compostos bioativos de folhas de *C. heliotropiifolius*. Adotou-se o método de extração assistida por ultrassom. Utilizou-se o planejamento Doehlert para otimizar as variáveis significativas. Concluiu-se que, o ultrassom e o planejamento Doehlert foram eficazes para determinar as condições ótimas de extração. No segundo capítulo, objetivou-se verificar o efeito do extrato de *C. heliotropiifolius* na germinação, nodulação e no crescimento do feijão-caupi. Foram instalados quatro ensaios sucessivos. Utilizaram-se diferentes volumes do extrato. Como fontes de nitrogênio, houve inoculação das sementes com estirpes de bactérias diazotróficas e adubação com N mineral. O volume de 1 mL do extrato diluído 25% (v/v) em água, não afetou a germinação, crescimento e nodulação da cultura. Assim, o emprego do extrato diluído 25% (v/v) até o volume de 1 mL poderá ser utilizado em futuros testes, para avaliar seu potencial frente a patógenos que acometem a cultura do feijão-caupi.

**Palavras-chave:** *Euphorbiaceae*, método de ultrassom, *Vigna unguiculata*

## OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN *Croton heliotropiifolius* Kunth AND APPLICATION OF THE EXTRACT IN THE GROWTH OF COWPEA

**Abstract:** *Croton heliotropiifolius* extract is promising for the formulation of natural products, which have the ability to inhibit the growth of rhizospheric pathogens that affect the cowpea culture. However, the plant benefits from the technology of biological nitrogen fixation (FBN). Thus, it is essential that even the use of natural products formulated to inhibit pathogens, do not negatively affect the nodulation and efficiency of the symbiosis between the species and the diazotrophic bacteria. This study is divided into two chapters. The objective of the first chapter was to determine the best conditions for extracting bioactive compounds from leaves of *C. heliotropiifolius*. The ultrasound-assisted extraction method was adopted. Doehlert planning was used to optimize the significant variables. It is concluded that, ultrasound and Doehlert planning were effective to determine the optimal conditions of extraction. In the second chapter, the objective was to verify the effect of *C. heliotropiifolius* extract on the germination, nodulation and growth of cowpea. Four successive tests were installed. Different volumes of the extract were used. As nitrogen sources, seeds were inoculated with strains of diazotrophic bacteria and fertilization with mineral N. The volume of 1 mL of the extract diluted 25% (v / v) in water, did not affect the germination, growth and nodulation of the culture. Thus, the use of the diluted extract 25% (v / v) up to the volume of 1 mL can be used in future tests, to evaluate its potential against pathogens that affect the cowpea culture.

**Key Words:** *Euphorbiaceae*, ultrasound method, *Vigna unguiculat*

## INTRODUÇÃO

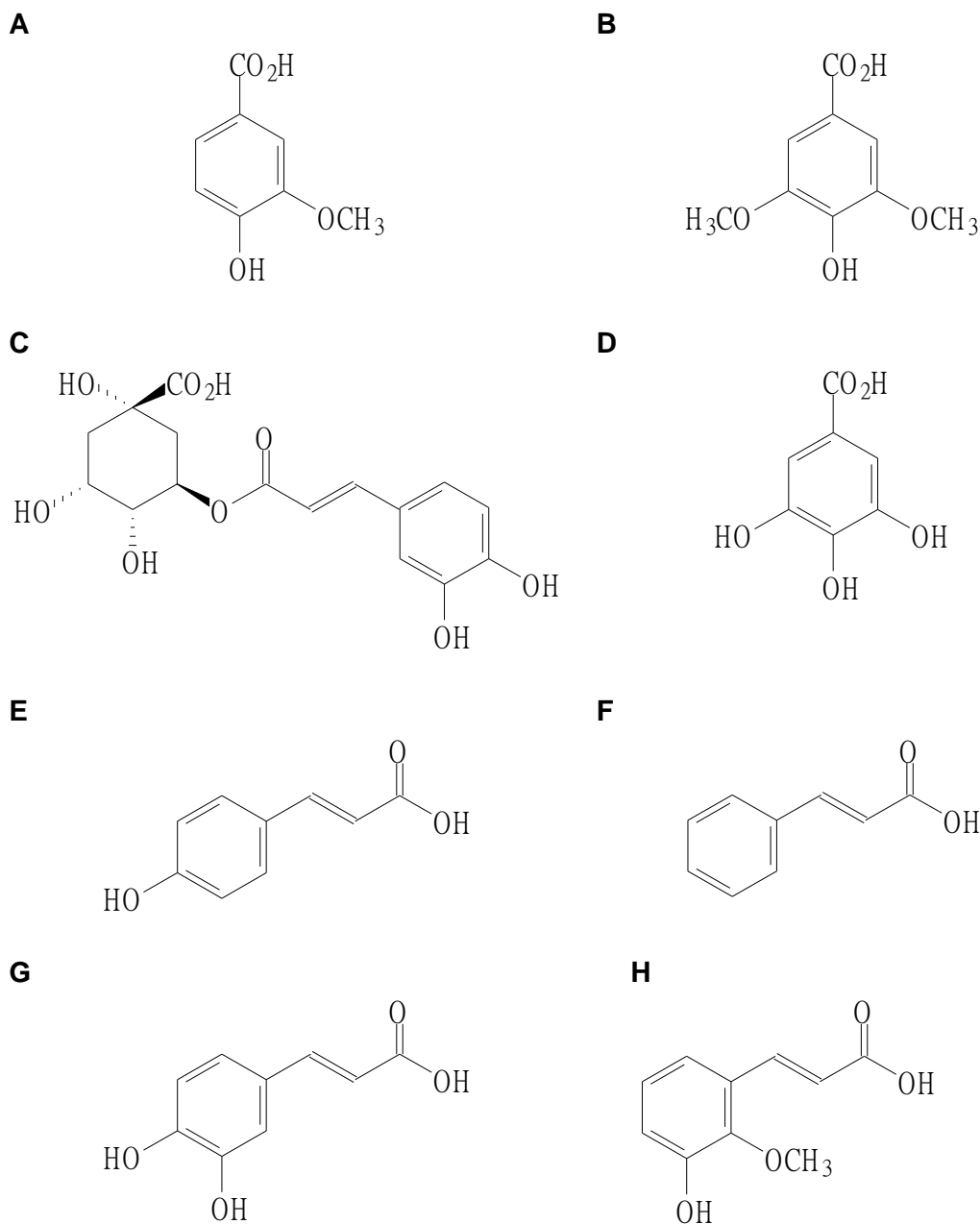
Diversas plantas de grande importância alimentar são acometidas por patógenos que causam doenças, prejudicando assim, a qualidade e produção da cultura. Dentre estas, pode-se citar a cultura do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], uma leguminosa amplamente nutritiva (CHAVES et al., 2018), com grãos ricos em proteínas, além de minerais, carboidratos, aminoácidos e vitaminas, (DEVI; KUSHWAKA; KUMAR, 2015). As regiões Norte e Nordeste do país são suas maiores produtoras e, no Nordeste sua produção é proveniente da agricultura familiar (FREIRE FILHO et al., 2011). A produtividade da cultura é beneficiada pela fixação biológica de nitrogênio (FBN), com a inoculação de estirpes autorizadas para a cultura (BRASIL, 2011), como também a inoculação de outras estirpes eficientes para o cultivo do feijão-caupi (SOUSA, 2017; CHAVES et al., 2018). Entretanto, a produção da cultura é severamente prejudicada por patógenos do solo e sementes, que causam a podridão de raízes e caules.

Para controlar estas podridões, a maioria dos produtores rurais recorre ao uso de produtos convencionais que levam a contaminação do Meio Ambiente, o que reforça a necessidade pela busca de produtos naturais que apresentem eficiência no controle de patógenos que acometem plantas de feijão-caupi, como os extratos vegetais. Estudos mostram efeito satisfatório no uso de extratos vegetais para o controle do crescimento de patógenos que causam doenças em plantas (SILVA, J. A. et al., 2009; FERREIRA et al., 2014; BRITO e NASCIMENTO, 2015).

Devido a essa problemática, tem crescido o interesse pela extração de compostos do metabolismo secundário de plantas medicinais que tenham potencial de controle biológico, visto que, poderão servir como base para formulação de produtos naturais eficientes, que ao mesmo tempo não gerem impacto negativo ao Meio Ambiente, como os extratos vegetais (SILVA, C. et al., 2017).

Dentre as plantas medicinais, destacam-se diversas espécies do gênero *Croton*, que pertencem à família das Euphorbiaceae e, são conhecidas pelo seu potencial no tratamento de várias doenças, sendo amplamente usadas na medicina tradicional (RIBEIRO et al., 2014; CORDEIRO e FÉLIX, 2014; ALMEIDA et al., 2015). Algumas espécies desse gênero possuem importantes atividades biológicas, como: ação inseticida, antifúngica, antioxidante e antimicrobiana (FERNANDES, 2016).

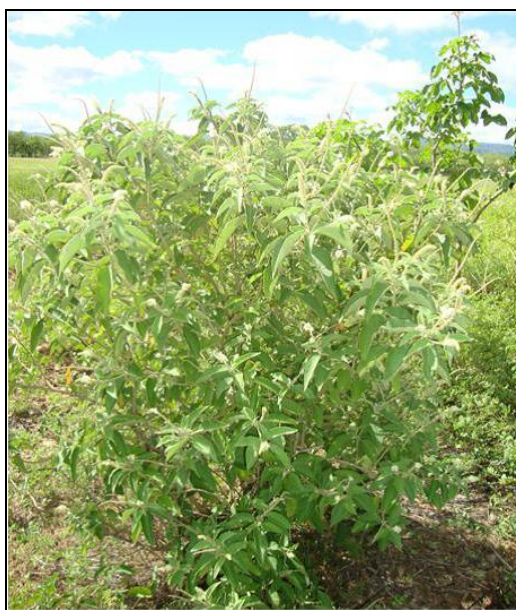
Estudos mostram que as plantas do gênero *Croton* têm uma gama de compostos fenólicos (Figura 1), que são compostos sintetizados por meio do metabolismo secundário da planta, conferindo as mesmas proteção contra fatores bióticos e abióticos adversos e, possuem várias propriedades antioxidantes (BENETTI et al., 2013; BALLI et al., 2020).



**Figura 1.** Estrutura de compostos fenólicos: Ácido vanílico (A); Ácido siríngico (B); Ácido clorogênico (C); Ácido gálico (D); Ácido *p*-cumárico (E); Ácido *trans*-cinâmico (F); Ácido cafeico (G); Ácido ferúlico (H).

Dentre os compostos fenólicos que foram identificados em espécies do *Croton* estão os flavonoides, que se apresentam em maior porcentagem em relação a outros compostos, além de fazerem parte do núcleo principal das espécies estudadas (BARRERA et al., 2016). Nas plantas, os flavonoides desempenham diversas funções, dentre as quais, pigmentação das flores e frutos, regulação do crescimento vegetal, proteção contra agentes oxidativo (SILVA et al., 2015), além de exercerem importante função no processo de FBN.

Entre as espécies do gênero *Croton*, destaca-se o *Croton heliotropiifolius* Kunth (Figura 2), que é endêmica da região Nordeste do Brasil e, comumente conhecida como “velame”, “velaminho” (SILVA, J. et al., 2017) e “cassutinga” (ROCHA et al., 2016). É encontrada habitualmente em vegetação de caatinga, sobre solo arenoso ou areno-argiloso, podendo também ser encontrada em cerrados e restingas (SILVA, J. S. et al., 2009). A espécie possui propriedades medicinais (ROCHA et al., 2016), o que demonstra ser uma fonte de produtos naturais biologicamente ativo.



**Figura 2.** Planta de *Croton heliotropiifolius*. **Fonte:** Angélico, E. C. (2011).

Devido à sua importância, estudos têm sido desenvolvidos com diferentes partes das plantas de *C. heliotropiifolius* para preparo de extratos vegetais e óleos essenciais, com intuito de verificar sua ação biológica, identificar e quantificar sua composição química (QUEIROZ et al., 2014; ALENCAR FILHO et al., 2017; ARAÚJO et al., 2017; BRITO et al. 2018).

Existem diversos métodos para obtenção de extratos vegetais, alguns considerados convencionais, como: maceração, hidrodestilação, destilação a vapor e soxhlet, outros considerados métodos mais avançados, como: extração com fluido super crítico, extração assistida por micro-ondas e extração assistida por ultrassom (BARROS et al., 2014; XU et al., 2017).

A extração assistida por ultrassom se caracteriza por ser um método rápido, eficiente, preciso, simples e de baixo custo (FERREIRA et al., 2014) e, vem sendo utilizado para atender aos princípios da Química Verde, haja vista que, tem-se tornado crescente a preocupação da comunidade científica em desenvolver métodos de extração ambientalmente sustentáveis, como o emprego de técnicas de extração mais ecológica, o menor consumo de energia, a mínima ou não geração de resíduos nocivos ao Meio Ambiente, além da utilização de solventes orgânicos não tóxicos (TSUKUI; REZENDE, 2014). Na literatura é reportada que a extração de compostos vegetais é mais eficiente pelo método de ultrassom em comparação a método convencional (DENG et al., 2017; JOVANOVIC et al., 2017), e também em comparação a métodos mais modernos (RODSAMRAN & SOTHORNVIT, 2019; HADIDI et al., 2020).

O ultrassom produz turbulência e agitação do solvente, o que gera cavitações (JADHAV et al., 2009). Tais cavitações promovem ruptura na parede celular da amostra, permitindo que o solvente penetre com mais facilidade na matriz vegetal, o que leva a maior transferência do analito, promovendo assim, maior rendimento dos compostos vegetais extraídos (CORBIN et al., 2015; FERREIRA et al., 2014). Menor espaço de tempo de extração e maior rendimento nas concentrações de compostos bioativos extraídos é relato no trabalho de Silva et al (2016) e KAN et al (2020), ao utilizarem ultrassom.

Para otimização de procedimentos analíticos como o rendimento de extração de compostos bioativos, pode-se utilizar as metodologias univariada ou multivariada, na univariada a otimização do preparo da amostra é realizada com o estudo de apenas uma variável por vez, já na multivariada é feito o estudo de todas as variáveis ao mesmo tempo (BENETTI, et al., 2013), assim, a multivariada torna o processo de otimização mais rápido e econômico. Para a otimização das variáveis que afetam de forma significativa a resposta analítica é utilizada a metodologia de superfície de resposta (MSR) (BALLI et al., 2020). Dentre as MSR pode-se citar o planejamento

fatorial de três níveis, composto central, Box-Behnken e Matriz de Doehlert. (FERREIRA et al., 2007).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foi otimizar o procedimento de extração de compostos fenólicos em folhas de *C. heliotropiifolius* e, verificar seu efeito na germinação, nodulação e crescimento do feijão-caupi.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR FILHO, J. M. T.; ARAÚJO, L. C.; OLIVEIRA, A. P.; GUIMARÃES, A. L.; PACHECO, A. G. M.; SILVA, F. S.; CAVALCANTI, L. S.; LUCCHESSE, A. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; ARAÚJO, E. C. C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 440-444, 2017. Doi.org/10.1016/j.bjp.2017.02.004.

ALMEIDA NETO, J. R.; BARROS, R. F. M.; SILVA, P. R. R. Uso de plantas medicinais em comunidades rurais da Serra do Passa-Tempo, estado do Piauí, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 3, p. 165-175, 2015.

ANGÉLICO, E. C. **AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE *Croton heliotropiifolius* KUNTE e *Croton blanchetianus* BAILL.** Dissertação (Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural). Patos – PB, 87 p., 2011.

ARAÚJO, F. M.; DANTAS, M. C. S. M.; SILVA, L. S.; AONA, L. Y. S.; TAVARES, I. F.; SOUZA-NETA, L. C. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 105, p. 203-206, 2017. Doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.016.

BALLI, D.; BELLUMOI, M.; ORLANDINI, S.; CECCHIA, L.; MANIA, E.; PIERACCINI, G.; MULINACCI, N.; INNOCENTI, M. Optimized hydrolytic methods by response surface methodology to accurately estimate the phenols in cereal by HPLC-DAD: The case of millet. **Food Chemistry**, v. 303, 2020. DOI.org/10.1016/j.foodchem.2019.125393.

BARRERA, C. S. C.; GÓMEZ, D. C.; CASTIBLANCO, F. A. Importancia medicinal del género *Croton* (euphorbiaceae). **Revista Cubana de Plantas medicinales**, v. 21, n. 2, p. 234-247, (2016). Acesso em 18 de fevereiro de 2020, disponível em: <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/348>.

BARROS, N. A.; ASSIS, A. V. R.; MENDES, M. F. Extração do óleo de manjerição usando fluido supercrítico: análise experimental e matemática. **Ciência Rural**, v. 44, n. 8, p. 1499-1505, 2014. Doi.org/10.1590/0103-8478cr20130917.



BENETTI, C.; COLUSSI, T. C.; BOVO, F.; SANTA, H. S. D., PEREZ, E. Otimização da extração de compostos fenólicos em uma biofarinha de maçã enriquecida com *Agaricus brasiliensis*. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 15, n. 2, p. 255-273, 2013. DOI: 10.5935/RECEN.2013.02.06.

BRASIL. **Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011 anexo** – protocolo oficial para avaliação da viabilidade e eficiência agrônômica de cepas, inoculantes e tecnologias relacionados ao processo de fixação biológica de nitrogênio em leguminosas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, nº 58 de 25 mar. 2011.

BRITO, N. M.; NASCIMENTO, L. C. Potencial fungitóxico de extratos vegetais sobre *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 2, p. 230-238, 2015. Doi. 10.1590/1983-084X/10\_057.

BRITO, S. S. S.; SILVA, F.; MALHEIRO, R.; BAPTISTA, P.; PEREIRA, J. A. *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. **Industrial Crops & Products**, v. 113, p. 308-315, 2018. Doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.044

CHAVES, J. S.; OLIVEIRA, G. A.; RODRIGUES, T. G.; MAIA, S. S.; TEIXIRA JÚNIOR, D. L.; SOUZA, F. G.; RODRIGUEZ, C. A. Produtividade do feijão-caupi sob inoculação em área alterada no Estado de Roraima – Brasil **Nucleus**, v. 15, n. 2, p. 319-324, 2018. Doi.10.3738/1982.2278.2814.

CORBIN, C.; FIDEL, T.; LECLERC, E. A; BARAKZOY, E.; SAGOT, N.; FALGUIÉRES, A.; RENOARD, S.; BLONDEAU, J. P.; FERROUD, C.; DOUSSOT, J.; LAINÉ, E.; HANO, C. Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. **Ultrason Sonochem**, v. 26, p. 176-185, 2015. Doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.02.008.

CORDEIRO, J. M. P.; FÉLIX, L. P. Conhecimento botânico medicinal sobre espécies vegetais nativas da caatinga e plantas espontâneas no agreste da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 3, 685-692, 2014.

DENG, J.; XU, Z.; XIAN, C.; LIU, J.; ZHAU, L.; LI, T.; YANG, Z.; DING, C. Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 328-334, 2017. Doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.023.

DEVI, C. B.; KUSHWAHA, A.; KUMAR, A. Sprouting characteristics and associated changes in nutritional composition of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6821-6827, 2015.

FERNANDES, D. N. M. **Composição Química, Atividade Antimicrobiana e Antioxidante do Óleo Essencial de *Croton tetradenius* Baill (EUPHORBIACEAE)**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, (DISSERTAÇÃO). Itapetinga, BA, 2016, 74p.

FERREIRA, B. L.; CHAVES, E. S.; \*; VIALICH, J.; SAUER, E. Extração assistida por ultrassom para determinação de Fe, K e Na em amostras de achocolatado em pó. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 3, p. 236-242, 2014. Doi.org/10.1590/1981-6723.1514.

FERREIRA, E. F.; SÃO JOSÉ, A. R.; BOMFIM, M. P.; PORTO, J. S.; JESUS, J. S. Uso de extratos vegetais no controle *in vitro* do *Colletotrichum gloeosporioides* penz. Coletado em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 346-352, 2014. Doi.org/10.1590/0100-2945-223/13.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; SILVA, E. G. P.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; DAVID, J. M.; ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; BARROS NETO, B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 2-14, 2007. DOI.org/10.1016/j.chroma.2007.03.051

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E.V. Feijão-caupi no Brasil : produção, melhoramento genético, avanços e desafios. –Teresina, PI: **Embrapa Meio-Norte**, 2011. 84 p. : il. ; 27 cm. ISBN 978-85-88388-21-5.

HADIDI, M.; IBARZ, A.; PAGAN, J. Optimisation and kinetic study of the ultrasonic-assisted extraction of total saponins from alfalfa (*Medicago sativa*) and its bioaccessibility using the response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 309, n. 9, 2020. Doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125786.

JADHAV, D.; REKHA, B. N.; GOGATE, P. R.; RATHOD, V. K. Extraction of vanillin from vanilla pods: a comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 4, p. 421-426, 2009. Doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.02.007.

JOVANOVIC, A. A.; DORDEVIC, V. B.; ZDUNIC, G. M.; PLJEVLJAKUSUC, D. S.; SAVIKIN, K. P.; GODEVAC, D. M.; BUGARSKI, B. M. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. **Separation and Purification Technology**, v. 179, p. 369-380, 2017. Doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.055.

KAN, X.; YAN, Y.; RAN, L.; LU, L.; MI, J.; ZHANG, Z.; LI, X.; ZENG, X.; CAO, Y. Ultrasonic-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography purification of zeaxanthin dipalmitate from the fruits of *Lycium barbarum* L. **Food Chemistry**, v. 310, n. 25, 2020. Doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125854.

QUEIROZ, M. M. F.; QUEIROZ, E. F.; ZERAIK, M. L.; MARTI, G.; FAVRE-GODAL, Q.; SIMÕES-PIRES, C.; MARCOURT, L.; CARRUPT, P. A.; CUENDET, M.; PAULO, M. Q.; BOLZANI, V. S.; WOLFENDER, J. L. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. **Phytochemistry Letters**, v. 761, n of, 2014. Doi.org/10.1016/j.phytol.2014.08.013.

RIBEIRO, D. A.; MACÊDO, D. G.; OLIVEIRA, L. G. S.; SARAIVA, M. E.; OLIVEIRA, S. F.; SOUZA, M. M. A.; MENEZES, I. R. A. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 912-930, 2014.

ROCHA, T. O.; FREITAS, J. S.; SANTOS, E. S. L.; SCALDAFERRI, M. M.; OLIVEIRA, C. G.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. Estimate of genetic diversity in cassutinga (*Croton heliotropiifolius*) based on molecular markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 13, p. 518-523, 2016. DOI: 10.5897/AJB2015.15009.

RODSAMRAN, P.; SOTHORNVIT, R. Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. **Food Bioscience**, v. 28, p. 66-73, 2019.

SILVA, C.; GARCIA, V. A. S.; FRANCISCATO, L. M. S. S. Extração Assistida por Ultrassom de Compostos Bioativos das Cascas de Lichia (*Litchi Chinensis* Sonn.). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n. 1, p. 82-96, 2016.

SILVA, C. P.; RICCI, T. G.; ARRUDA, A. L.; PAGLIOSA, F. M.; MACEDO, M. L. R. Extratos Vegetais de Espécies de Plantas do Cerrado Sul-Matogrossense com Potencial de Bioherbicida e Bioinseticida. **UNICIÊNCIAS**, v. 21, n. 1, p. 25-34, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.17921/1415-5141.2017v21n1p25-34>.

SILVA, J. A.; PEGADO, C. M. A.; RIBEIRO, V. V.; BRITO, N. M.; NASCIMENTO, L. C. Efeito de extratos vegetais no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em sementes de caupi. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 612-616, 2009. Doi.org/10.1590/S1413-70542009000200039.

SILVA, J. A. G.; SILVA, G. C.; SILVA, M. G. F.; SILVA, V. F.; AGUIAR, J. S.; SILVA, T. G.; LEITE, S. P. Physicochemical characteristics and cytotoxic effect of the methanolic extract of *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 28, p. 321-326, 2017. DOI: 10.5897/AJPP2017.4798.

SILVA, J. S.; SALES, M. F.; CARNEIRO-TORRES, D. S. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na Microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 879-901, 2009. Doi.org/10.1590/2175-7860200960409.

SILVA, L. B.; TORRES, E. B.; SILVA, K. F.; SOUZA, J.S.N.; LOPES, M.S.; ANDRADE, L.H.; XAVIER, Z. F. Toxicity of Ethanolic Extract of *Croton heliotropiifolius* in Weevil Populations of Stored Maize Grains. **Journal of Entomology**, v. 9, n. 6, p. 413-421, 2012. DOI: 10.3923/je.2012.413.421.

SILVA, L. R.; VALE, L. M.; LAMA, B. F. C.; DEUS, M.; SOCORRO, M.; FERREIRA, P. M. P.; PERON, A. P. Flavonóides; constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica Argentina**, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

SOUSA, J. X. **Promoção do crescimento vegetal por bactérias oriundas de solos com histórico de deposição de manipueira**. 2017. 61 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Qualidade de Ecossistemas)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas, 2017.

TSUKUI, A.; REZENDE, C. M. Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde, **Revista Virtual de Química**, v. 6, p. 1713-1725, 2014.  
<http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20140111>

XU, C-C.; WANG, B.; PU Y-Q.; TAO J-S.; ZHANG T. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 10, p. 0721-0731, 2017.

## CAPÍTULO 1

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS EM FOLHAS DE *Croton heliotropiifolius*  
Kunth<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Artigo publicado na Revista Microchemical Journal.

## OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM FOLHAS DE *Croton heliotropiifolius* Kunth

**RESUMO:** *Croton heliotropiifolius* é uma planta endêmica da região Nordeste do Brasil, possui propriedades medicinais, e já foi constatado sua ação antifúngica, antioxidante, antimicrobiana e seu efeito larvicida. Além disso, tem-se identificado compostos químicos presentes no óleo essencial e extratos vegetais da espécie. Existem diversos métodos para extração vegetal, dentre estes, a extração assistida por ultrassom permite a extração de compostos fenólicos de forma mais eficiente em menor espaço de tempo. Diante do exposto, objetivou-se determinar as melhores condições para obtenção de compostos fenólicos em folhas de plantas de *Croton heliotropiifolius*, por meio da extração assistida por ultrassom. Para otimização dos flavonoides totais foi montado um planejamento fatorial (2<sup>4</sup>) para triagem das variáveis mais significativas. Posteriormente, o planejamento de matriz de Doehlert foi utilizado para otimizar a porcentagem do solvente, volume do extrator, temperatura e tempo de extração. Por meio do CLAE, foram identificados 12 compostos nas amostras do extrato de *C. heliotropiifolius*: Kaempferol, catequina, ácido gálico, quercetina, ácido vanílico, ácido elágico, ácido cafeico, ácido trans-cinâmico, ácido p-cumárico, ácido siríngico, ácido ferúlico e ácido clorogênico. As condições ótimas encontradas foram: 11,4 mL de etanol 37,5% v/v, a uma temperatura de 54,8°C por 39,5 minutos em banho ultrassônico.

**Palavras-chave:** compostos bioativos, planejamento Doehlert, solução hidroetanólica

## OPTIMIZATION OF ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF COMPOUNDS BIOACTIVES IN LEAVES OF *CROTON heliotropiifolius* Kunth

**ABSTRACT:** *Croton heliotropiifolius* is an endemic plant in the Northeast region of Brazil, which has medicinal properties, and scientifically its antifungal, antioxidant, antimicrobial and larvicidal effects have already been verified. In addition, chemical compounds present in essential oil and plant extracts of the species have been identified. There are several methods for plant extraction, among them, ultrasound-assisted extraction, which allows the extraction of phenolic compounds more efficiently in less time. Given the above, the objective was to determine the best conditions for extracting phenolic compounds from leaves of *Croton heliotropiifolius* plants. The extraction of phenolic compounds in leaves of *C. heliotropiifolius* was developed by means of an ultrasonic bath. To optimize the total flavonoids, a factorial design ( $2^4$ ) was set up to screen the most significant variables. Then the Doehlert Matrix planning was used to optimize the percentage of the solvent, extractor volume, temperature and extraction time. Twelve compounds were identified in the samples of the *C. heliotropiifolius* extract: Kaempferol, catechin, gallic acid, quercetin, vanillic acid, ellagic acid, caffeic acid, trans-cinnamic acid, p-cumáric acid, siringuic acid, ferulic acid and chlorogenic acid. The optimum conditions found were: 11.4 mL of 37.5% v / v ethanol, at a temperature of 54.8 ° C for 39.5 minutes in an ultrasonic bath.

**Keywords:** bioactive compounds, Doehlert planning, hydroethanolic solution

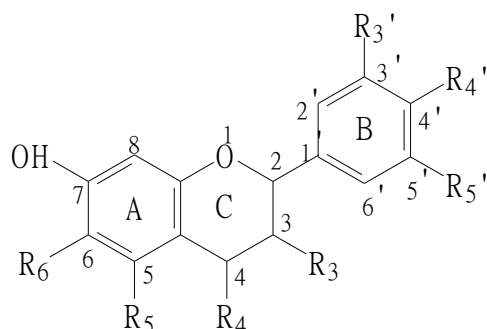
## INTRODUÇÃO

*Croton heliotropiifolius* pertence à família das Euphorbiaceae (SALATINO et al., 2007). A espécie é endêmica da região Nordeste do Brasil, sendo mais encontrada em vegetação de Caatinga (ANGÉLICO et al., 2014). Comprovaram-se atividades biológicas para a espécie, tais como: ação antifúngica (QUEIROZ et al., 2014; BRITO et al., 2018), antioxidante (SILVA et al., 2017), antimicrobiana (ARAÚJO et al., 2017) e efeito larvicida (DÓRIA et al., 2010). Essas atividades são atribuídas a composição química dos extratos vegetais e óleos essenciais.

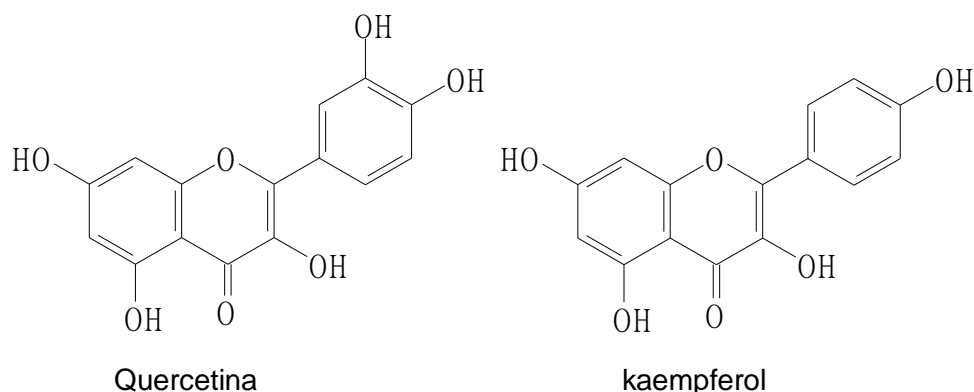
A espécie é uma planta medicinal e, tem despertado maior interesse de estudo devido seu potencial bioativo. Pesquisas recentes, identificaram diversos compostos químicos presentes no óleo essencial do *C. heliotropiifolius*, como o (*E*)-caricofileno,  $\gamma$ -muroleno, viridifloreno (ARAÚJO et al., 2017), limoneno,  $\alpha$ -pinene, caryophyllene etc, (BRITO et al., 2018). No extrato metanólico da planta foi identificado a presença de flavonoides (SILVA et al., 2017).

Os flavonoides fazem parte do grupo dos compostos fenólicos, estando presentes em todos os vegetais. Sua biossíntese ocorre em resposta da planta contra fatores adversos, conferindo à mesma melhor adaptação, além de estarem estreitamente envolvidos com a qualidade das plantas medicinais (SINGH et al., 2017). Esses compostos ocorrem em uma variedade de formas estruturais, todas contendo a estrutura básica formada por dois anéis aromáticos (A e B) ligados por um anel pirano (C) (Figura 1, A). As substituições nos anéis A e B e as variações no padrão do anel C, resultam em importantes classes de flavonoides, como os flavonóis (Figura 1, B), flavonas, isoflavonas, catequinas, entre outros.

**A**





**B**

**Figura 1** – Estrutura básica dos flavonoides (A). Exemplos de flavonoides: quercetina e kaempferol (B).

O interesse pela extração de flavonoides têm sido crescente (YU et., 2019), principalmente em plantas com potencial bioativo (HOSSAIN e SHAH, 2015). Entretanto, obter uma extração eficiente associado a um bom rendimento desses compostos é o grande entrave (GHITESCU et al., 2015; YU et., 2019). Sendo, portanto, primordial o desenvolvimento de um procedimento que melhor extraia os compostos desejáveis (DHANANI et al., 2017).

A extração dos compostos no material vegetal é o ponto de partida para se identificar como também quantificar os analitos presentes nas plantas. Atualmente, há diversos métodos para a extração vegetal, dentre estes, pode-se citar alguns convencionais como a extração sólido-líquido e extração por alta pressão hidrostática e, métodos mais modernos, como a extração assistida por micro-ondas e extração assistida por ultrassom (XU et al., 2017).

Os métodos convencionais requerem o uso de grande quantidade de solventes orgânicos, procedimentos analíticos longos e pouco eficientes. Isso pode ocasionar degradações, comprometendo a qualidade e o rendimento do extrato final, além do potencial para poluição ambiental devido ao grande volume de solventes utilizados.

Por essas razões, os tradicionais métodos de extração têm sido substituídos por outras metodologias que são mais sensíveis, seletivas, rápidas e ambientalmente seguras, como o método de banho ultrassônico. O ultrassom ocasiona uma melhor separação do analito da amostra. Com o aumento da temperatura, ocorre à formação de bolhas de cavitação que entram em colapso e,

aumentam a pressão, o que facilita a penetração do solvente na matriz, e assim, há um maior contato do solvente com o analito, promovendo maior solubilidade do mesmo (BENDICHO et al., 2012). Compostos fenólicos são extraídos em menor espaço de tempo e com um menor gasto de solvente utilizando extrações assistidas por ultrassom, quando comparado a método convencional (DENG et al., 2017; LIMA et al., 2018; ROCHA et al., 2018), e também em comparação a método contemporâneo, como extração assistida por microondas (RODSAMRAN, SOTHORNVIT, 2019).

Diversos fatores influenciam no processo de extração de compostos bioativos vegetais, dentre os quais, a matriz vegetal, o solvente, o tempo e a temperatura (PHUONG et al., 2020). Pesquisas demonstram diferentes métodos de extração vegetal do *C. heliotropiifolius*, com a aplicação de diferentes condições de temperatura, solvente, tempo, métodos de extração e partes distintas da planta. Queiroz (et al., 2014) fizeram a extração de compostos químicos presentes no caule da planta usando o método de maceração com etanol. Já SILVA (et al., 2017), utilizaram o caule, folhas e flores da espécie, tendo metanol como solvente.

Para a otimização de métodos analíticos, pode ser utilizada a estatística univariada ou multivariada. A multivariada é mais vantajosa que a univariada, por necessitar de um menor número de experimentos, o que reflete em menor tempo e gasto de solvente. Além de permitir, avaliar a interação entre os fatores estudados, e deste modo, é mais confiável que a univariada (NOVAES et al., 2017).

Hipotetiza-se neste estudo que, a extração por meio do banho ultrassônico com uso do solvente hidroetanólico irá beneficiar a extração de compostos bioativos em folhas de *Croton heliotropiifolius*.

Diante do exposto, objetivou-se determinar as melhores condições para extração de flavonoides e outros compostos bioativos em folhas de plantas de *Croton heliotropiifolius*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostra

Plantas de *Croton heliotropiifolius* foram coletadas na cidade de Jequié, Bahia, Brasil, localizada nas seguintes coordenadas geográficas: latitude 13° 51' 4" S e longitude 40° 4' 52" W. A coleta ocorreu no mês de março de 2018, que corresponde à estação do verão no Estado, período em que as plantas metabolizam maior concentração de metabólitos secundários na região.

### Preparo das amostras

Folhas de *C. heliotropiifolius* foram fragmentadas e seguiram para secagem em estufa com ar circulante a uma temperatura média de 45°C, durante quatro dias, até perderem toda a umidade. Posteriormente, foram trituradas em moinho de facas do tipo Willey usando peneira de 1,5 mm até se obter um material mais homogêneo, promovendo também aumento na superfície de contato das partículas. Em seguida, foram armazenadas em recipientes de vidro com tampa e mantidas no congelador até serem usadas.

### Solventes e reagentes

Água utilizada foi ultrapura obtida (18,2 MΩ cm) de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). O Etanol utilizado foi obtido pela J. T. Baker (Xalostoc, Edo. De Méx., MÉXICO). Os padrões de quercetina, ácido elágico, ácido serínico, kaempferol, catequina, ácido *trans-cinâmico*, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido clorogênico, ácido *p-cumárico*, ácido gálico foram provenientes da Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO, USA).

### Instrumentação

As amostras foram sonicadas em tubos de ensaio utilizando o ultrassom (Elma Ultrasonic S10H (tipo), f.: 50/60 Hz, P.: 90 W), (Alemanha), e em seguida centrifugadas por dois minutos a 1125 G.

Foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, LC-20AD Prominence, Shimadzu, Japão), que possui quatro bombas de alta pressão (LC-20AD, Shimadzu, Japão), mais detectores de arranjo de diodos (DAD, SPD20A, Shimadzu, Japão), interfaceados em série (CBM-20A, Shimadzu, Japão) com uma coluna RP 18 "LiChrospher" (5  $\mu\text{m}$ , 4,6  $\times$  250 mm, Agilent, Brasil) e controlada pelo software LC-System.

### **Planejamento experimental**

A otimização multivariada do procedimento de extração foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa foi utilizado um planejamento fatorial completo de dois níveis ( $2^4$ ). Os fatores e os níveis estudados foram: concentração da solução extratora (30% e 70% de etanol), volume (5 mL e 15 mL), tempo de sonicação (2 min. e 20 min.) e temperatura (30°C e 70°C), (Tabela 1); com o objetivo de determinar quais fatores influenciam de forma significativa a resposta analítica. Na segunda etapa utilizou-se a matrix de Doehlert como metodologia de superfície de resposta para otimização das variáveis estatisticamente significativas.

### **Extração assistida por ultrassom**

Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,2 g de amostra e 11,4 mL de solução hidroetanólica de concentração 37,5% (v v<sup>-1</sup>). A amostra foi colocada em banho ultrassônico a 54,8 °C, por 39,5 minutos. Posteriormente, as amostras foram levadas à centrífuga por dois minutos a fim de facilitar a separação do sobrenadante do resíduo sólido. O experimento foi realizado em triplicata (?). A amostra foi filtrada através de um filtro descartável LC de 0,45  $\mu\text{m}$ , transferida para um vial de injeção para posterior análise por HPLC.

### **Determinação de flavonoides totais**

A determinação de flavonoides totais foi realizada por espectrofotometria molecular, utilizando o espectrofotômetro TECNAL® a 750 nm (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil), em leitura de 408nm, e a resposta foi lida em absorvância. Adotou-se a metodologia proposta por Marques et al., (2012) com algumas

alterações. Para o procedimento, uma alíquota de 500µl do extrato foi inserida em balão volumétrico de 10 ml, onde se adicionou 2 ml de solução etanólica de  $AlCl_3$  (5%, m v<sup>-1</sup>), ajustando o volume do balão com solução hidroalcolica (40%, v v<sup>-1</sup>). Cada amostra foi lida em duplicata e, para a leitura da curva foi utilizada uma solução com padrão de quercetina. Os pontos de calibração da curva foram 0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,4 ppm.

### **Análise cromatográfica das folhas de *C. heliotropiifolius***

O extrato foi filtrado utilizando um filtro de 0,45µm, posteriormente foram injetadas no HPLC. Para a fase estacionária utilizou uma coluna RP 18 (5 µm, 4,6 x 250 mm) com a temperatura de 40°C. A fase móvel foi formada por dois solventes: o metanol (solvente A) e, ácido acético com concentração final de 1% (v v<sup>-1</sup>) misturado a água ultrapura (solvente B). O gradiente utilizado foi 0-10 min, 100% A; 10-20 min, 70% A; 20-30 min, 10% A; 30-37 min, 70% A e 37-40 min, 100% A, a um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Foram identificados os seguintes compostos: Kaempferol, catequina, ácido gálico, quercetina, ácido vanílico, ácido elágico, ácido cafeico, Ácido *trans*-cinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido siríngico, ácido ferúlico e ácido clorogênico. Foram utilizados distintos comprimentos de ondas, sendo: ácido vanílico e ácido elágico (260 nm); ácido siríngico (272 nm); ácido gálico, ácido ferúlico, ácido *trans*-cinâmico e catequina (280 nm); ácido *p*-cumárico (310 nm); ácido clorogênico e ácido cafeico (330 nm); quercetina e kaempferol (360 nm).

### **Análise estatística**

Para otimização dos flavonóides totais foi montado um planejamento fatorial (2<sup>4</sup>) para triagem das variáveis mais significativas. Posteriormente, o planejamento de matriz de Doehlert foi utilizado para otimizar a concentração e o volume da solução hidroetanólica, a temperatura e o tempo de extração.

Todos os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o programa Statistica 7.0 para Windows (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, EUA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Planejamento Fatorial Completo

O planejamento fatorial completo de dois níveis foi utilizado para a triagem das variáveis que afetaram de forma significativa a resposta analítica que é a porcentagem de extração de flavonoides totais em folhas de *Croton heliotropiifolius*. Na Tabela 1 são apresentados os resultados do planejamento fatorial completo, as respostas são expressas em equivalente de Quercetina por g de amostras.

EXPERIMENTOS	ETANOL (%)	VOLUME (mL)	TEMPO (Min.)	TEMPERATURA (°C)	FLAVONOIDES TOTAIS <sup>1</sup>
1	30(-) <sup>2</sup>	5 (-)	2 (-)	30 (-)	9,14
2	70(+)	5 (-)	2 (-)	30 (-)	5,08
3	30(-)	15 (+)	2 (-)	30 (-)	6,9

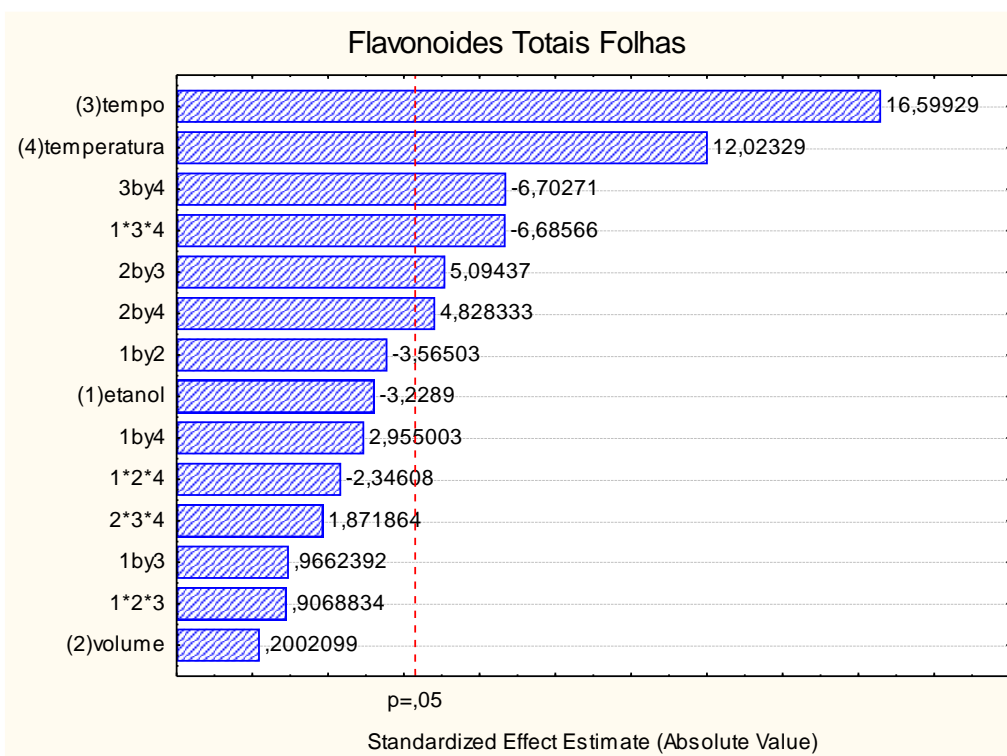
**Tabela 1.** Planejamento fatorial completo de dois níveis (2<sup>4</sup>) na extração de flavonoides totais das folhas de *Croton heliotropiifolius*.

<b>4</b>	70(+)	15 (+)	2 (-)	30 (-)	<b>2,52</b>
<b>5</b>	30 (-)	5 (-)	20 (+)	30 (-)	<b>12,71</b>
<b>6</b>	70(+)	5 (-)	20 (+)	30 (-)	<b>13,75</b>
<b>7</b>	30 (-)	15 (+)	20 (+)	30 (-)	<b>12,87</b>
<b>8</b>	70(+)	15 (+)	20 (+)	30 (-)	<b>12,73</b>
<b>9</b>	30 (-)	5 (-)	2 (-)	70 (+)	<b>9,8</b>
<b>10</b>	70(+)	5 (-)	2 (-)	70 (+)	<b>14,03</b>
<b>11</b>	30 (-)	15 (+)	2 (-)	70 (+)	<b>11,78</b>
<b>12</b>	70(+)	15 (+)	2 (-)	70 (+)	<b>10,87</b>
<b>13</b>	30 (-)	5 (-)	20 (+)	70 (+)	<b>13,21</b>
<b>14</b>	70(+)	5 (-)	20 (+)	70 (+)	<b>12,41</b>
<b>15</b>	30 (-)	15 (+)	20 (+)	70 (+)	<b>17,9</b>
<b>16</b>	70(+)	15 (+)	20 (+)	70 (+)	<b>15,04</b>
<b>17</b>	50 (C)	10 (C)	11 (C)	50 (C)	<b>13,50</b>
<b>18</b>	50 (C)	10 (C)	11 (C)	50 (C)	<b>12,32</b>
<b>19</b>	50 (C)	10 (C)	11 (C)	50 (C)	<b>13,19</b>

<sup>1</sup> Concentração expressa em mg de Quercetina g<sup>-1</sup>, <sup>2</sup>(-) Limite inferior, (C) Ponto central, (+) Limite superior.

A partir do planejamento fatorial completo (Tabela 1) foi construído o gráfico de Pareto (Figura 2). Conforme pode ser observado na Figura 2, o fator tempo e temperatura foram significativos ( $P < 0,05$ ) dentro do intervalo estudado, e ambas as variáveis tiveram efeito positivo no rendimento de flavonoides extraídos no extrato das folhas de *C. heliotropiifolius*.

O tempo foi o fator que apresentou maior efeito no rendimento da extração, destacando que, o método de ultrassom proporciona melhor eficiência desse fator, sendo, portanto, considerado mais vantajoso para extração vegetal (DHANANI et al., 2017). Como pode ser observado no trabalho de Lima et al. (2018), o fator tempo influenciou diretamente no teor de compostos fenólicos extraídos, e o uso do ultrassom promoveu uma redução no tempo gasto de 240 minutos para 15 minutos, em relação a método convencional.



**Figura 2.** Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo de dois níveis ( $2^4$ ) na extração das folhas de *C. heliotropiifolius*.

A temperatura foi a segunda variável que influenciou positivamente no rendimento de extração (FIGURA 2), a mesma é considerada um fator chave na extração assistida por ultrassom, pois influencia nas características físicas e químicas do produto extraído (ESCLAPEZ et al., 2011), promove redução na viscosidade do solvente utilizado, levando ao aumento da extração dos compostos vegetais (WANG et al., 2008; TORRES et al., 2018), e influencia diretamente na solubilidade dos compostos fenólicos (GUERRA et al., 2016). Assim, a mesma exerce influência direta na interação entre o solvente e o soluto (MARTINS et al., 2013).

A interação entre os fatores tempo e temperatura foi significativa ( $P < 0,05$ ) com sinal negativo, indicando que, quanto menor for o tempo de extração maior deverá ser a temperatura, para se obter maior rendimento de compostos bioativos extraídos em folhas de *C. heliotropiifolius* (FIGURA 2). Observa-se o mesmo comportamento para interação entre os fatores: concentração de etanol, tempo e temperatura, mostrando que, com o aumento da temperatura houve um decréscimo no tempo de extração e também na concentração de etanol. Tal



comportamento justifica-se pelo fato de que, o maior aquecimento promovido pelo aumento da temperatura, levou a completude da parede celular, promovendo maior rendimento de extração dos compostos de natureza polar com ligação fraca na estrutura da amostra, necessitando assim, de um menor gasto de tempo e de etanol (Figura 2).

Similarmente, Guerra et al. (2016) e Moreira; Dias (2018) verificaram interação significativa entre os fatores tempo e temperatura na extração de compostos fenólicos

Verifica-se ainda na Figura 2 que, os fatores concentração da solução etanólica e volume do solvente, isoladamente, não foram significativos ( $p > 0,05$ ). Entretanto, por se observar interações entre essas variáveis juntamente as variáveis tempo e temperatura, foi realizada a otimização de todas conjuntamente.

### **Planejamento Doehlert**

Para otimizar os fatores que são estatisticamente significativos, na extração de flavonoides totais de folhas de *C. heliotropiifolius*, foi utilizado uma metodologia de superfície de resposta (matriz Doehlert). A matriz de Doehlert é um modelo utilizado na otimização multivariada, que permite reduzir o número de experimentos a serem realizados em comparação a uma metodologia univariada (FERREIRA et al., 2004; BENINI e ROSSI, 2019), visto que, permite o estudo de vários fatores simultaneamente (RUSCHEL et al., 2016), sendo considerada um procedimento simples, confiável e sensível (MOREIRA; DIAS 2018).

O planejamento Doehlert foi realizado de acordo com os experimentos descritos na Tabela 2, onde são apresentados os valores codificados, os valores reais e as respostas dos rendimentos de extração. Na Tabela 2 é apresentado o planejamento Doehlert para otimização de flavonoides totais em folhas de *C. heliotropiifolius*, em que a resposta foi dada em  $\text{mg g}^{-1}$  de Quercetina.

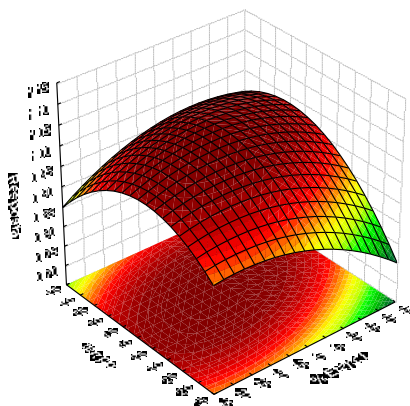
**Tabela 2.** Matriz de Doehlert para as variáveis estatisticamente significativas.

<b>EXPERIMENTOS</b>	<b>ETANOL (%)</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>TEMPO (Min.)</b>	<b>VOLUME (mL)</b>	<b>FLAVONOIDES TOTAIS <sup>1</sup></b>
<b>1</b>	40 <sup>2</sup> (0) <sup>3</sup>	65 (0)	40 (0)	10 (0)	<b>1,011</b>
<b>2</b>	40 (0)	65 (0)	40 (0)	10 (0)	<b>1,098</b>
<b>3</b>	40 (0)	65 (0)	40 (0)	10 (0)	<b>1,000</b>
<b>4</b>	60 (1)	65 (0)	40 (0)	10 (0)	<b>1,021</b>
<b>5</b>	50 (0,5)	80 (0.866)	40 (0)	10 (0)	<b>0,953</b>
<b>6</b>	50 (0,5)	70 (0.289)	60 (0.817)	10 (0)	<b>0,997</b>
<b>7</b>	50 (0,5)	70 (0.289)	50 (0.204)	15 (0.791)	<b>0,904</b>
<b>8</b>	20 (-1)	65 (0)	40 (0)	10 (0)	<b>0,978</b>
<b>9</b>	30 (0,5)	50 (-0.866)	40 (0)	10 (0)	<b>1,035</b>
<b>10</b>	30 (-0.5)	60 (-0.289)	20(-0.817)	10 (0)	<b>0,956</b>
<b>11</b>	30 (-0.5)	60 (-0.289)	30(-0.204)	5 (-0.791)	<b>1,004</b>
<b>12</b>	50 (0.5)	50 (-0.866)	40 (0)	10 (0)	<b>1,023</b>
<b>13</b>	50 (0.5)	60 (-0.289)	20(-0.817)	10 (0)	<b>0,936</b>
<b>14</b>	50 (0.5)	60 (-0.289)	30(-0.204)	5 (-0.791)	<b>0,881</b>
<b>15</b>	30 (0,5)	80 (0.866)	40 (0)	10 (0)	<b>0,984</b>
<b>16</b>	40 (0)	75 (0.577)	20(-0.817)	10 (0)	<b>0,888</b>
<b>17</b>	40 (0)	75 (0.577)	30(-0.204)	5 (-0.791)	<b>0,927</b>
<b>18</b>	30 (0,5)	70 (0.289)	60 (0.817)	10 (0)	<b>0,939</b>
<b>19</b>	40 (0)	55 (-0.577)	60 (0.817)	10(0)	<b>0,989</b>
<b>20</b>	40 (0)	65 (0)	55 (0.613)	5 (-0.791)	<b>1,015</b>
<b>21</b>	30 (0,5)	70 (0.289)	50 (0.204)	15 (0.791)	<b>0,997</b>
<b>22</b>	40 (0)	55 (-0.577)	50 (0.204)	15 (0.791)	<b>0,997</b>
<b>23</b>	40 (0)	65 (0)	25(-0.613)	15 (0.791)	<b>0,972</b>

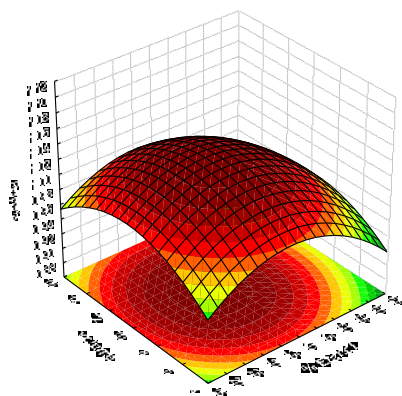
<sup>1</sup> Concentração expressa em mg de Quercetina g<sup>-1</sup>; <sup>2</sup> Valores reais; (<sup>3</sup>) Valores codificados.

Na Figura 3 ilustra-se o gráfico de superfície de resposta, onde são apresentados os valores ótimos para as variáveis estudadas (tempo, temperatura, porcentagem de etanol e volume do solvente) na extração de flavonoides totais em folhas de *C. heliotropiifolius*. As condições ótimas de extração foram: 37,5% de etanol v/v e volume de 11,4 mL por 39,5 minutos a uma temperatura de 54,8 °C.

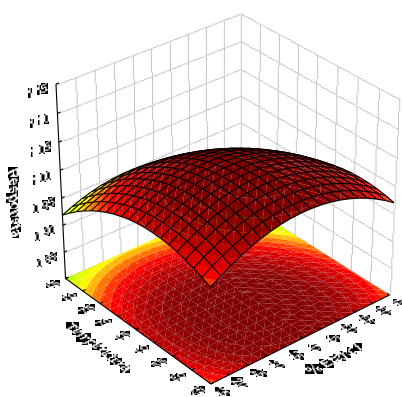
A



B



C



**Figura 3-** Gráfico de superfície de resposta da otimização das variáveis que foram significativas na extração de flavonoides totais em folhas de *C. heliotropiifolius*.

Observa-se na Figura 4 (A) ponto de máximo, sendo 39,5 minutos o tempo ótimo para um maior rendimento de extração. O tempo (tempo de contato entre o soluto e o solvente) é um fator que exerce influência direta no teor de compostos fenólicos extraídos em matrizes vegetais (LIMA et al., 2018), assim, tempos inferiores de extração aos desejáveis, levam a um menor rendimento de compostos extraídos (YINGNGAM et al., 2015), pois, não permite que o solvente penetre na amostra de forma eficiente. Do mesmo modo, tempos superiores podem ocasionar modificação química do analito (SANTOS et al., 2011), ou ainda, levar a degradação dos compostos que se objetiva extrair.

A temperatura ideal encontrada neste trabalho (54,8°C com a duração de 39,5 min. no ultrassom) favoreceu maior rendimento de flavonoides extraídos em folhas de *C. heliotropiifolus* Figura 3 (B). Similarmente, observou-se maior rendimento na extração de compostos fenólicos quando a temperatura atingiu os 54°C, utilizando-se solvente hidroetanólico (GHITESCU et al., 2015).

A solução hidroetanólica na faixa de 37,5% v/v de Etanol, foi a que proporcionou maior rendimento de extração nas condições experimentais estudadas. Foram utilizadas no presente artigo diferentes concentrações de solução hidroetanólica, resultando em diferentes polaridades do solvente. A água age aumentando a polaridade de alguns solventes, resultando em maior rendimento de extração (CHIGAYO et al., 2016; TORRES et al., 2018), uma vez que a polaridade do extrator utilizado tem uma relação direta no rendimento dos compostos extraídos (GUERRA et al., 2016). Neste trabalho, a modificação da polaridade do solvente pela diminuição do teor de etanol, foi mais eficaz para a extração dos compostos bioativos de natureza polar presentes em folhas de *Croton heliotropiifolius*. Pois, substâncias de alta polaridade são solúveis apenas em solventes polares, do mesmo modo, as apolares têm afinidade com solventes apolares (MARTINS et al., 2013).

O solvente formado pela mistura de etanol/água é considerado mais ecológico (ESCLAPEZ et al., 2011), e vai de encontro aos princípios da química verde, que preconiza o uso de estratégias sustentáveis, como a utilização de solventes orgânicos alternativos que não gerem resíduos nocivos ao meio

ambiente (TSUKUI; REZENDE 2014), além de, serem eficientes na extração de compostos fenólicos (QUINTÃO et al., 2013).

Na Figura 4 (C), observa-se a relação ideal entre o volume de solvente utilizado e o maior teor de flavonoides extraídos, sendo 11,4 mL de solução hidroetanólica o volume em que se obteve maiores rendimentos de extração. Este resultado assegura um menor custo de extração, ao mesmo tempo em que minimiza possíveis problemas ambientais causados pela geração de resíduos laboratoriais. O maior rendimento de compostos bioativos extraídos de matrizes vegetais foi verificado com a utilização de solvente hidroetanólico, em relação a outros solventes utilizados (SARTORI et al., 2013; PALIOTO et al., 2015; HOSSAIN; SHAH 2015).

Na tabela 3 são apresentadas diferentes condições de respostas de rendimento para extração de compostos bioativos em espécies vegetais, com distintas condições de tempo, temperatura e solventes, empregando o ultrassom. A extração assistida por ultrassom é mais eficiente, e se caracteriza como uma tecnologia rápida e ecológica, que permite maior rendimento de extração em menos tempo utilizando menos solvente Ferreira et al. (2019). Em diversos trabalhos são apresentados efeito positivo no rendimento de compostos bioativos, ao se utilizar o ultrassom. Guerra et al. (2016) encontraram um aumento de 10% no rendimento de compostos fenólicos com o ultrassom, em relação ao método convencional. Similarmente, Sanches et al. (2017) verificaram maior rendimento de compostos vegetais extraídos, ao empregar o método de extração assistida por ultrassom. Phuong et al. (2020) observaram que, o ultrassom promoveu um aumento de 15% no rendimento de compostos fenólicos.

Diante do exposto, evidencia-se que a extração de compostos presentes nas folhas do *C. heliotropiifolius* foi favorecida pelo emprego do ultrassom com o uso do solvente hidroetanólico.

**Tabela 3.** Respostas de rendimentos para extração de compostos bioativos em espécies vegetais, com o emprego do ultrassom.

Planta	Solvente	Tempo	Temperatura	Biomassa/Solvente	FT <sup>1</sup>	FVT <sup>2</sup>	Autor
<i>Allium sativum</i>	71,22% metanol	13.4 9	59	20.48 mL/g	19.612mg <sup>3</sup>	1.435 mg <sup>4</sup>	CIRIC et al. (2020)
<i>Crinum asiaticum</i>	60% etanol	47	64	28 mL/g	-	1,6397 2% mg <sup>4</sup>	YU et al. (2019)
<i>Physalis angulata</i>	57% água 35% etanol 8% metanol	10	30	15 mL/g	6,3mg <sup>3</sup>	-	MOREIRA; DIAS (2018)
<i>Piper betle</i>	78,74% etanol	30	51.6	21.85 mL/g	289.05mg <sup>3</sup>	21.50 mg <sup>4</sup>	ALI et al. (2018)
<i>Olives (Olea europea L.)</i>	80% metanol	30	47	22 mL g	7,01mg <sup>3</sup>	-	DENG et al. (2017)
<i>Tommy Atkins</i>	50% etanol	60	60	8 mL/0,0 2 g	2125.30mg <sup>3</sup>	-	GUERRA et al. (2016)
<i>Croton heliotropiifolius</i>	37,5% solução hidroetanólica	39.5	55	11.4 mL/0,2 g	-	7.2 mg <sup>5</sup>	PRESENT E TRABALHO

\* (FT<sup>1</sup>): Fenólicos totais; (FVT<sup>2</sup>): Flavonoides totais; <sup>3</sup>(EAG): Equivalente Ácido Gálico; <sup>4</sup>(RE) ou (RUT): Equivalente Rutina; <sup>5</sup>(QE): Equivalente Quercetina.

### 3.3. Teste de adição e recuperação e determinação de compostos bioativos em folhas de *C. heliotropiifolius*

Para verificar a exatidão do método analítico, foi realizado o teste de adição e recuperação. Para a realização do teste, acrescentaram-se no extrato de folhas de *Croton heliotropiifolius* diferentes concentrações de quercetina. A recuperação foi calculada mediante a seguinte equação:  $R(\%) = (C_s - C_o) / (C_{add}) \times 100$ , o  $C_s$  compreende a concentração do analito na amostra juntamente ao valor adicionado, o  $C_o$  é a concentração do analito na amostra e, o  $C_{add}$  é o quantidade de analito que foi adicionado a amostra. Os resultados encontrados variam de 88

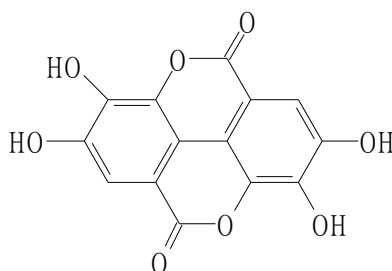
a 94% (Tabela 4), demonstrando não haver interferência da matriz da amostra na recuperação do método proposto para este estudo.

**Tabela 4.** Teste de adição e recuperação em amostras do extrato de folhas de *Croton heliotropiifolius*.

Analito	Adicionado (mg L <sup>-1</sup> )	Encontrado (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperado (%)
Quercetina	0,0	6,3	
	5,0	11	94
	10,0	15	88

Observa-se um rendimento de 7.2 mgQE/g<sup>-1</sup> de compostos bioativos extraídos em folhas de *Croton heliotropiifolius*, por meio das condições ideais de extração (Tabela 4), resultado que evidencia a eficiência do solvente hidroetanólico no processo de extração, ao se comparar com rendimento encontrado de 1,43 mg RUT/g com uso do metanol (CIRIC et al., 2020) e, 21,50 mgRE/g com etanol (ALI et al., 2018).

A determinação e quantificação da composição química do extrato otimizado de folhas de *Croton heliotropiifolius* estão descritas na (Tabela 5). Das três amostras de extratos de folhas de *Croton heliotropiifolius* foram identificados 12 compostos bioativos: catequina, quercetina, kaempferol, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido elágico e ácido *trans*-cinâmico. Observa-se na Tabela 5 que, dentre os compostos identificados, o ácido elágico (Figura 5) é o principal composto químico ativo no extrato de folhas de *C. heliotropiifolius*.



**Figura 4** – Estrutura básica do ácido elágico.

O ácido elágico é um derivado dimérico (molécula composta por duas partes iguais) do ácido gálico, e pode ocorrer nas seguintes formas: livre, glicosilada ou na forma de complexo simples (SALINAS-MORENO et al., 2009). A forma estrutural em que o ácido elágico ocorre está diretamente relacionada a sua solubilidade, fator que influencia na biodisponibilidade e bioatividade do mesmo (ALFEI et al., 2019). Este composto possui atividade antioxidante, anti-inflamatória e hepática (ABDELKADER et al., 2020). Assim, o extrato de *C. heliotropiifolius* se mostra como um produto promissor, sendo importante a realização de futuros testes, para avaliar o potencial antioxidante e demais atividades biológicas do mesmo.

**Tabela 5.** Quantificação dos compostos fenólicos identificados no extrato otimizado de *Croton heliotropiifolius*.

<b>Amostras</b>	<b>Vanílico</b> (mg g <sup>-1</sup> )	<b>Siríngico</b> (mg g <sup>-1</sup> )	<b>Clorogênico</b> (mg g <sup>-1</sup> )
<i>Croton 1</i>	0,40 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,49 ± 0,01
<i>Croton 2</i>	0,32 ± 0,02	0,36 ± 0,19	<LQ
<i>Croton 3</i>	0,19 ± 0,03	1,06 ± 0,03	1,56 ± 0,1
<b>Amostras</b>	<b>Elágico</b> (mg g <sup>-1</sup> )	<b>P-Cumárico</b> (µg g <sup>-1</sup> )	<b>Cafeico</b> (mg g <sup>-1</sup> )
<i>Croton 1</i>	17,2 ± 9,17	3,39 ± 0,06	<LQ
<i>Croton 2</i>	17,7 ± 0,01	2,45 ± 0,06	<LQ
<i>Croton 3</i>	14,6 ± 7,43	0,61 ± 0,08	<LQ
<b>Amostras</b>	<b>Quercetina</b> (mg g <sup>-1</sup> )	<b>Kaempferol</b> (mg g <sup>-1</sup> )	<b>Gálico</b> (mg g <sup>-1</sup> )
<i>Croton 1</i>	<LQ <sup>1</sup>	<LQ	1,78 ± 0,02
<i>Croton 2</i>	2,04 ± 0,14	<LQ	0,49 ± 0,11
<i>Croton 3</i>	2,59 ± 1,21	<LQ	<LQ
<b>Amostras</b>	<b>Catequina</b> (mg g <sup>-1</sup> )	<b>Trans-Cinâmico</b> (mg g <sup>-1</sup> )	<b>Ferúlico</b> (mg g <sup>-1</sup> )
<i>Croton 1</i>	1,87 ± 0,03	< LQ	< LQ
<i>Croton 2</i>	1,45 ± 0,53	2,2 ± 0,2	6,1 ± 0,7
<i>Croton 3</i>	1,92 ± 0,83	< LQ	< LQ

<sup>1</sup> Limite de Quantificação.



## CONCLUSÕES

O procedimento desenvolvido para a extração de flavonoides totais é eficiente, rápido, simples e está de acordo com os princípios da química verde. O planejamento Doehlert é eficaz na determinação das condições ótimas de extração de flavonoides totais em folhas *Croton heliotropiifolius* Kunth assistida por ultrassom, sendo estas: 11,4 mL de 37,5% v/v de etanol, a uma temperatura de 54,8°C por 39,5 minutos no ultrassom. O planejamento Doehlert também se mostra uma ferramenta importante para a determinação de compostos químicos presentes no extrato de *C. heliotropiifolius*, dos doze compostos fenólicos identificados o Ácido Elágico é o majoritário.

## REFERÊNCIAS

- ABDELKADER, N. F.; ELYAMANY, M.; GAD, A. M.; ASSAF, N.; FAWZY, H. M.; ELESAWY, W. H. Ellagic acid attenuates liver toxicity induced by valproic acid in rats, **J. Pharmacol. Sci.**, v. 143, p. 23-29, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2020.01.007>
- ALFEI, S.; TURRINI, F.; CATENA, S.; ZUNIN, P.; GRILLI, M.; PITTALUGA, A. M.; BOGGIA, R. Ellagic acid a multi-target bioactive compound for drug discovery in CNS? A narrative review, **Eur. J. Med. Chem.**, v. 183, p. 1-60, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111724>
- ALI, A.; LIM, X. Y.; CHONG, C. H.; MAH, S. H.; CHUA, B. L. Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from *Piper betle* using response surface methodology, **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 89, p. 681-688, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.033>
- ANGÉLICO, E. C.; RODRIGUES, O. G.; COSTA, J. G. M.; LUCENA, M. F. A.; NETO, V. Q.; MEDEIROS, R. S. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils and *Croton's* varieties modulator in the Brazilian Northeast semiarid. **Academic Journal**, v. 8, p. 392-397, 2014.
- ARAÚJO, F. M.; DANTAS, M. C. S. M.; SILVA, L. S.; AONA, L. Y. S.; TAVARES, I. F.; SOUZA-NETA, L. C. Antibacterial activity and chemical composition of the

essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil.

**Industrial Crops and Products**, v. 105, p. 203-206, 2017.

Doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.016.

BENDICHO, C.; CALLE, I.; PENA, F.; COSTAS, M.; CABALEIRO, N.; LAVILLA, I.

Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 50-60, 2012.

BENINI, L.; ROSSI, M. A. C. O planejamento experimental Doehlert na caracterização da rugosidade como função dos parâmetros de entrada do processo de fresamento do aço ABNT 1020. **The Journal of Engineering and Exact Sciences – JCEC**, v. 5, n. 4, p. 13, (2019). Doi:

10.18540/jcecvl5iss4pp0338-0350.

BRITO, S. S. S.; SILVA, F.; MALHEIRO, R.; BAPTISTA, P.; PEREIRA, J. A.

*Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. **Industrial Crops & Products**, v. 113, p. 308-315, 2018. Doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.044.

CIRIC, A.; KRAJNC, B.; HEATH, D.; OGRINC, N. Response surface methodology and artificial neural network approach for the optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from garlic, **Food Chem. Toxicol.**, v. 135, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110976>

CHIGAYO, R.; MOJAPELO, P. E. L.; MNYAKENI-MOLEELE, S.;

MISIHAIABGWI, J. M. Phytochemical and antioxidant properties of different solvent extracts of *Kirkia wilmsii* tubers. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 12, p. 1037-1043, 2016.

DHANANI, T.; SHAH, S.; GAJBHIYE, N. A.; KUMOR, SATYANSHU. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 1193-1199, 2017.

DENG, J.; XU, Z.; XIAN, C.; LIU, J.; ZHAU, L.; LI, T.; YANG, Z.; DING, C.

Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives, **Ultrason. Sonochem**, v. 37, p. 328-334, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.023>.

DÓRIA, G. A. A.; SILVA, W. J.; CARVALHO, G. A.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. H. A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 6, p. 615-620, 2010.

ESCLAPEZ, M. D.; GARCI´A-PE´REZ, J. V.; A. MULET, A.; CA´RCEL, J. A.

Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 2, p. 108-120, 2011.

- FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; B. NETO, B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. **Talanta**, v. 63, ed. 4, p. 1061-1067, 2004. Doi.org/10.1016/j.talanta.2004.01.015.
- FERREIRA, T. M. S.; SANTOS, J. A.; MODESTO, L. A.; SOUZA, L. S.; SANTOS, M. P. V.; BEZERRA, D. G.; PAULA, J. A. M. An eco-friendly method for extraction and quantification of flavonoids in *Dysphania ambrosioides*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 29, p. 266-270, 2019.
- GUERRA, A. P.; GARCIA, V. A. S.; SILVA, C. Otimização da extração de compostos fenólicos da casca de manga (*Tommy atkins*) utilizando processo assistido por ultrassom. **E-xacta**, v. 9, n. 1, p. 103-110, 2016. Doi: 10.18674/exacta.v9i1.1783e.
- GHITESCU, R-E.; VOLF, I.; CARAUSU, C.; BÜHLMANN A-M.; GILCA, L, A.; POPA, V. I. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 535-541, 2015.
- HOSSAIN, M. A.; SHAH, M. D. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, p. 66-71, 2015.
- LIMA, I. A. S. I.; RIBEIRO, I. A.; NERIS, T. S.; SILVA, S. S.; LOSS, R. A.; GUEDES, S. F. Extração de compostos fenólicos do noni (*Morinda citrifolia Linn*) empregando energia ultrassônica. **Scientia Plena**, v. 14, n. 4, p. 7, 2018.
- MARQUES, G. S. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata*. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.
- MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013. Doi. Org/10.1590/S0100-404220013000800026.
- MOREIRA, G. C.; DIAS, F. S. Mixture design and Doehlert matrix for optimization of the ultrasonic assisted extraction of caffeic acid, rutin, catechin and trans-cinnamic acid in *Physalis angulata* L. and determination by HPLC DAD. **Microchemical Journal**, v. 141, p. 247-252, 2018. Doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.035.
- NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; DE PAULA, V. F.; DO NASCIMENTO JÚNIOR, B. B.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta - Parte I: variáveis de processo. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1184-1215, 2017. DOI: 10.21577/1984-6835.20170070.

PALITO, G.F.; SILVA, C.F.G.; MENDES, M.P.; ALMEIDA, V.V.; ROCHA, C.L.M.S.C.; TONIN, L.T.D. Composição centesimal, compostos bioativos e atividade antioxidante de frutos de *Morinda citrifolia* Linn (noni) cultivados no Paraná. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 59-66, 2015. DOI.10.1590/1983-084X/ 13\_066.

PHUONG, N. N. M.; LE, T. T.; DANG, M. Q.; CAMP, J. V.; RAES, K. Selection of extraction conditions of phenolic compounds from rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) peel. **Food and Bioproducts Processing**, v. 122, p. 222-229, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.05.008>

QUEIROZ, M. M. F.; QUEIROZ, E. F.; ZERAIK, M. L.; MARTI, G.; FAVRE-GODAL, Q.; SIMÕES-PIRES, C.; MARCOURT, L.; CARRUPT, P. A.; CUENDET, M.; PAULO, M. Q.; BOLZANI, V. S.; WOLFENDER, J. L. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. **Phytochemistry Letters**, v. 761, n of, 2014. DOI.org/10.1016/j.phytol.2014.08.013.

QUINTÃO, F. J. O.; TAVARES, R. S. N.; S. N. TAVARES; VIEIRA-FILHO, S. A.; SOUZA; G. H. B.; SANTOS, O. D. H. Hydroalcoholic extracts of *Vellozia squamata*: study of its nanoemulsions for pharmaceutical or cosmetic applications. **Brazilian Journal of Phasmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 101-107, 2013. DOI.org/10.1590/S0102-695X2013005000001

ROCHA, J. C. G.; PROCÓPIO, F. R.; MENDONÇA, A. C.; VIEIRA, L. M.; PERRONE, I. T.; BARROS, F. A. R.; STRINGHETA, P. C. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from jussara (*Euterpe edulis* M.) and blueberry (*Vaccinium myrtillus*) fruits. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 45-53, 2018.

RODSAMRAN, P.; SOTHORNVIT, R. Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. **Food Bioscience**, v. 28, p. 66-73, 2019.

RUSCHEL, C. F. C.; FERRÃOA, M. F.; SANTOS, F. P.; SAMIOS, D. Otimização do processo de transesterificação em duas etapas para produção de biodiesel através do planejamento experimental Doehlert. **Química Nova**, v. 39, n. 3, p. 267-272, 2016. Doi.org/10.5935/0100-4042.20160018.

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.

SALINAS-MORENO, Y.; ALMAGUER-VARGAS, G; PEÑA-VARELA, G.; RÍOS-SÁNCHEZ, R. Perfis de ácido elágico e antocianina em frutos de framboesa (

*Rubus idaeus* L.) em diferentes estádios de maturação, **Revista Chapingo Série de Horticultura**, v.15, n.1, p. 97-101. 2009.

SANCHES, M. N.; KAUSAR, T.; JABBAR, S.; MUMTAZ, A.; AHAD, K.; SADDZOAI, A. Extração de polifenóis da casca de kinnow (*Citrus reticulata* L.) usando técnicas de ultrassom e maceração. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, ed. 3, p. 488-500, 2017.

SANTOS, F. M.; SIMÕES, J. C.; SILVA, J. R. A.; BARTHUS, R. C., POPPI, R. J.; AMARAL, A. C. F. Otimização das condições de extração de saponinas em *Ampelozizyphus amazonicus* usando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1629-1633, 2011.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000900023>

SARTORI, J. A. S.; SCALIS, C.; BAPTISTA, A. S.; LIMA, . B.; AGUIAR, C. L. Parâmetros de influência na extração de compostos fenólicos de partes aéreas da cana-de-açúcar com atividade antioxidante total. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 297-307, 2013.

SILVA, J. A. G.; LIMA, I. R.; SANTANA, M. A. N.; SILVA, T. M. S.; SILVA, M. I. A. G.; LEITE, S. P. Screening Fitoquímico e Avaliação da Toxicidade de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae) frente à *Artemia salina* Leach. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 934-941, 2017.

SINGH, B., KUMAR, A., & MALIK, A. K. Flavonoids biosynthesis in plants and its further analysis by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 38, p. 820-832, 2017.

TORRES, D. S.; PEREIRA, E. C. V.; SAMPAIO, P. A.; SOUZA, N. A. C.; FERRAZ, C. A. A.; OLIVEIRA, A. P.; MOURA, C. A.; ALMEIDA, J. . G. S.; OLIM-NETO, P. J.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R. G.; ROLIM, L. A. Influência do método extrativo no teor de flavonoides de *Cnidocolus quercifolius* POHL (Euphorbiaceae) e atividade antioxidante. **Química Nova**, v. 41, n. 7, p. 743-747, 2018. Doi.org/10.21577/0100-4042.20170236.

TSUKUI, A.; REZENDE, C. M. Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde, **Revista Virtual de Química**, v. 6, p. 1713-1725, 2014.  
<http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20140111>

WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y.; LI, X. Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 804-810, 2008. Doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.062.

XU CONG-CONG.; WANG BING.; PU YI-QIONG.; TAO JIAN-SHENG.; ZHANG TONG. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant

materials. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 10, p. 0721-0731, 2017.

YU, M.; WANG, B.; QI, Z.; XIN, G.; LI, W. Response surface method was used to optimize the ultrasonic assisted extraction of flavonoids from *Crinum asiaticum*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2019. doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.09.018.

YINGNGAM, B.; SUPAKA, N.; RUNGSEEVIJITPRAPA, W. Optimization of process parameters for phenolics extraction of *Cratoxylum formosum* ssp. *formosum* leaves by response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 129-140, 2015.

## CAPÍTULO 2

### **GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E NODULAÇÃO DO FEIJÃO-CAUPI CULTIVADO COM EXTRATO DE *Croton heliotropiifolius* Kunth<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Industrial Crops & Products

## GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E NODULAÇÃO DO FEIJÃO-CAUPI CULTIVADO COM EXTRATO DE *Croton heliotropiifolius* Kunth

**RESUMO:** *Croton heliotropiifolius* é uma planta endêmica do bioma brasileiro e, foi identificada a presença de flavonoides no extrato vegetal da espécie e, comprovado seu potencial biológico. Devido a este potencial, o extrato poderá beneficiar a cultura do feijão-caupi que é acometida por podridões de sementes e doenças radiculares. Contudo, a produção do feijão-caupi é beneficiada pela fixação biológica de nitrogênio (FBN), por inoculantes de bactérias diazotróficas selecionadas para a cultura, sendo primordial, verificar primeiramente, o efeito do extrato sobre a nodulação da cultura. Diante disto, o objetivo do trabalho foi verificar o efeito do extrato de *C. heliotropiifolius* na germinação, nodulação e no crescimento de plantas de feijão-caupi. Três ensaios foram instalados utilizando areia lavada autoclavada como substrato e, um ensaio em solo Latossolo Amarelo distrófico (LAd). Foi utilizado em todos os ensaios sementes da Epace 10, que foram inoculadas com as seguintes estirpes de bactérias diazotróficas: INPA 03-11B, UFLA 03-84 e UFRB FA34C2-2 e, submetidas a diferentes doses do extrato. O emprego do extrato diluído em 25% (v/v) em água destilada até o volume de 1 mL não afetou a germinação das sementes. O extrato de *C. heliotropiifolius* não afeta negativamente a germinação, nodulação e crescimento de feijão-caupi, e, poderá ser usado até o volume de 1 mL na concentração citada anteriormente, em futuros testes para verificar seu potencial no controle do crescimento de patógenos que acometem o feijão-caupi.

**Palavras-chave:** flavonoides, fixação biológica de nitrogênio, *Vigna unguiculata*.



## GROWTH AND NODULATION OF COWPEA SUBMITTED DOSES OF EXTRACT OF *Croton heliotropiifolius* Kunth

**ABSTRACT:** *Croton heliotropiifolius* is an endemic plant of the Brazilian biome and, the presence of flavonoids in the plant extract of the species has been identified and its biological potential has been proven. Due to this potential, the extract may benefit the cowpea culture, which is affected by seed rot and root diseases. However, the production of cowpea is benefited by biological nitrogen fixation (FBN), by inoculants of diazotrophic bacteria selected for the culture, being essential, first, to verify the effect of the extract on the nodulation of the culture. In view of this, the objective of the study was to verify the effect of *C. heliotropiifolius* extract on germination, nodulation and on the growth of cowpea plants. Three tests were installed using autoclaved washed sand as a substrate and one test on dystrophic Yellow Latosol (LAd) soil. Epace 10 seeds were used in all assays, which were inoculated with the following strains of diazotrophic bacteria: INPA 03-11B, UFLA 03-84 and UFRB FA34C2-2 e, submitted to different doses of the extract. The use of the extract diluted in 25% (v/v) in distilled water up to the volume of 1 mL did not affect the germination of the seeds. The extract of *C. heliotropiifolius* does not negatively affect the germination, nodulation and growth of cowpea, and may be used up to the volume of 1 mL in the concentration mentioned above, in future tests to verify its potential in controlling the growth of pathogens that affect cowpea.

**Keywords:** flavonoids, biological nitrogen fixation, *Vigna unguiculata*

## INTRODUÇÃO

O gênero *Croton* compreende a maior família das Euphorbiaceae, somente no Brasil são encontradas 350 espécies deste gênero (SECCO et al., 2012), a espécie *C. heliotropiifolius* é endêmica da região Nordeste do país (BRITO et al., 2018), com ocorrência também nas regiões Sudeste e Centro-Oeste (ALENCAR FILHO et al., 2017). Óleo essencial e extratos vegetais extraídos dessa planta vêm sendo amplamente estudados, devido suas propriedades biológicas, tais como, efeito inseticida contra *Sitophilus zeamais* (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2013), potencial antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas e negativas (ALENCAR FILHO et al., 2017) e; atividade antifúngica frente a *Candida albicans* (QUEIROZ et al., 2014) e *C. parapsilosis* (BRITO et al., 2018). Também no óleo e no extrato da espécie é reportada a presença de diversos composto químicos, dentre eles os flavonoides (RODRIGUES et al., 2016; AQUINO et al., 2017; SILVA et al., 2017).

Os flavonoides são compostos fenólicos sintetizados pelas plantas. Sua síntese acontece por meio das vias acetato e a via shiquimato e, gerado a partir da fenilalanina (NABAVI et al., 2020). Os flavonoides exercem uma gama de funções para as plantas e também seres humanos, dentre as quais, propriedades antioxidantes e anti-inflamatória (CHEN et al., 2019), proteção às plantas contra fatores abióticos e bióticos (KHALID et al., 2019), mediam a interação benéfica entre plantas e fungos micorrízicos (SIQUEIRA et al., 2010), e atuam como moléculas sinalizadoras na interação simbiótica entre plantas e bactérias diazotróficas.

As bactérias diazotróficas são capazes de realizar a redução do  $N_2$  a amônia ( $NH_3$ ), forma assimilável para as plantas. Para que haja a simbiose, inicialmente é necessária uma troca de sinais entre o hospedeiro e o simbiote, ocorrendo por meio da exsudação dos flavonoides e isoflavonoides, que agem como sinalizadores químicos (HASSAM e MATHESIUS, 2012; MUS et al., 2016). A troca de sinais resulta na infecção da bactéria na planta (COOPER, 2004), mais especificamente na zona capilar da raiz (HASSAM e MATHESIUS, 2012). Os genes de nodulação são responsáveis pela produção de lipochitooligosaccharides (LOOs) chamados fatores Nod. Os fatores Nod são sinalizações simbióticas chave e são indispensáveis na especificidade na interação entre *Rhizobium*- hospedeiro desde os estágios iniciais do processo de infecção até a ortogênese dos nódulos (MUS et al., 2016).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), é uma leguminosa cultivada no Brasil, na África Ocidental e Central (IBRO et al., 2014), na Índia e em alguns países da América (MENDONÇA et al., 2015). A cultura se beneficia da fixação biológica de nitrogênio (FBN) e, no Brasil há inoculantes de bactérias diazotróficas selecionadas (Brasil, 2011) por meio de inúmeros ensaios de seleção em campo (COSTA et al., 2014a; COSTA et al., 2014b; MARINHO et al., 2017). Contudo, a cultura do feijão-caupi é acometida por doenças fúngicas que causam podridão de raízes e caule (LINHARES et al., 2016; NECHET e HALFELD-VIEIRA, 2011; CHAGAS JÚNIOR et al., 2014), prejudicando a qualidade e produção da cultura (OMOMOWO et al., 2018), fato que reforça a necessidade pela busca de alternativas que conduzam uma produção de caráter ecológico, de forma a minimizar uso de pesticidas.

Como os patógenos que causam tais podridões estão localizados no solo ou na semente e, considerando que a aplicação dos inoculantes de bactérias diazotróficas se dá por meio da inoculação nas sementes, é necessário primeiramente se verificar o efeito do extrato de *C. heliotropiifolius* nos inóculos que já são amplamente utilizados na cultura do feijão-caupi para o processo de FBN, para posteriormente se investigar o efeito do extrato sobre as doenças fúngicas que afetam a cultura. Neste contexto, uso do extrato de *Croton heliotropiifolius* otimizado para flavonoides pode favorecer a cultura do feijão-caupi, pelo potencial antifúngico já relatado para os flavonoides. Diante do exposto, hipotetiza-se que os flavonoides presentes no extrato de *Croton heliotropiifolius* não reduzem o crescimento e a nodulação do feijão-caupi.

Assim, objetivou-se verificar o efeito do extrato de *Croton heliotropiifolius* na nodulação e no crescimento de plantas de feijão-caupi.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos em casa-de-vegetação pertencente ao Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas (CCAAB) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), situada no município de Cruz das Almas – BA, localizada nas seguintes coordenadas geográficas: latitude 12° 40' 19" S e longitude 39° 06' 23" W.

Nos quatro ensaios instalados foram utilizadas sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) cultivar Epace 10, que antes da semeadura foram

desinfestadas superficialmente por 30 segundos em etanol 98%, depois um minuto no hipoclorito de sódio 1% (NaClO) e, na sequência lavagens com água destilada estéril (COSTA et al., 2014a). Como substrato, para os três primeiros ensaios consecutivos, utilizou-se areia lavada e autoclavada com intuito de avaliar o efeito do extrato de *C. heliotropiifolius* na germinação, crescimento e nodulação do feijão-caupi sem interferência de outros fatores.

O extrato de *C. heliotropiifolius* utilizado foi proveniente do método de otimização das melhores condições obtidas para flavonoides totais expresso em mg g<sup>-1</sup> de Quercetina (SOUSA, 2020).

Como fontes de nitrogênio para a cultura, as estirpes de bactérias diazotróficas utilizadas como inoculantes para o feijão-caupi foram: INPA 03-11B – Semia 6462 (*Bradyrhizobium elkanni*) (LACERDA et al., 2004), UFLA 03-84 – SEMIA 6461 (*Bradyrhizobium viridifuturi*) (COSTA et al., 2019) e UFRB FA34C2-2 (SOUSA, 2017), sendo as duas primeiras oriundas da Embrapa Agrobiologia e, autorizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2011), e a última está em fase de teste para inoculação da cultura. As bactérias foram colocadas para crescer em meio de cultura 79 semisólido, incubadas por cinco dias em BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a uma temperatura de 25°C para obtenção do inóculo, tendo para crescimento a fase log (10<sup>8</sup> UFC mL). Além disso, foram utilizadas outras fontes de N: solução nutritiva (HOAGLAND e ARNON, 1950) e adubação com nitrogênio mineral (fonte uréia).

Nos dois primeiros ensaios sucessivos que foram instalados, depositaram-se os substratos em recipientes com capacidade de 2 dm<sup>3</sup> e semearam-se cinco sementes em cada parcela experimental. Adotaram-se em ambos os ensaios o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em fatorial (3x4). No primeiro ensaio, utilizou-se como primeiro fator três fontes de nitrogênio (solução nutritiva com 210 mg L<sup>-1</sup> de N; solução nutritiva com 105 mg L<sup>-1</sup> de N e inoculação com a estirpe INPA 03-11B) e, o segundo fator foi constituído por volumes do extrato bruto de *C. heliotropiifolius* (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mL), com quatro repetições. Como testemunha, o mesmo experimento foi duplicado substituindo o extrato vegetal por solução (etanol/água) utilizada no processo de extração, a fim de verificar o efeito isolado da solução no crescimento e nodulação do feijão-caupi.

No segundo ensaio, o primeiro fator foi constituído pelas mesmas fontes de nitrogênio do ensaio anterior: (solução nutritiva com 210 mg L<sup>-1</sup> de N; solução

nutritiva com 105 mg L<sup>-1</sup> de N e inoculação com a estirpe INPA 03-11B), no segundo fator houve modificação para concentração do extrato, com diluição 50% (v/v) em água destilada e, dessa diluição foram usadas cinco volumes (0; 0,5; 1,0, 1,5 e 2,0 mL), com quatro repetições. Em ambos os ensaios, aos 15 dias após semeadura foram quantificados a porcentagem de emergência (% E) e o índice de velocidade de emergência (%VE).

Posteriormente, com as análises dos dois primeiros ensaios verificou-se que tanto os volumes do extrato bruto como do extrato diluído em 50% (v/v) em água destilada inibiram a germinação das sementes, sendo necessária uma nova diluição a fim de diminuir a concentração do extrato. Assim, o terceiro ensaio experimental foi instalado.

Para o terceiro ensaio areia lavada e autoclavada também foi utilizada como substrato de cultivo. O experimento foi disposto em DIC, no esquema fatorial (3x4), sendo o primeiro fator composto pelas fontes de nitrogênio (solução nutritiva com 210 mg L<sup>-1</sup> de N; solução nutritiva com 105 mg L<sup>-1</sup> de N e inoculação com a estirpe INPA 03-11B) e, para o segundo fator o extrato de *C. heliotropiifolius* foi diluído 25% (v/v) em água destilada e foram usados os volumes de (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mL). Cinco sementes em sacos de polietileno foram semeadas, e o desbaste foi realizado aos dez dias após emergência. Igualmente foi instalado um experimento testemunha com solução (etanol/água). Após a aptidão dos cotilédones iniciou-se a aplicação das soluções nutritivas (HOAGLAND e ARNON, 1950). As plantas que foram inoculadas com a estirpe INPA 03-11B receberam a solução nutritiva sem N. Para todos os tratamentos, as plantas receberam 50 mL de solução nutritiva a ½ força durante os primeiros oito dias, posteriormente, as plantas receberam a solução com força total até o desmonte do experimento, que ocorreu aos 46 dias após semeadura, no estágio (R2) da cultura que corresponde à floração. As variáveis avaliadas foram: (%E), (%VE), clorofila A (CLA), clorofila B (CLB) e clorofila TOTAL (CLT) [usando o clorofilômetro eletrônico para a determinação do índice de clorofila falker (ICF) entre as 08:00 e 10:00 horas da manhã]; número de folhas (NF) e número de nódulos (NN). As plantas foram segmentadas em parte aérea e raiz, postas em sacos de papel e acondicionadas em estufa de ar circulante a 60° C, até atingirem peso constante. Posteriormente, foi mensurada a matéria da parte aérea seca (MPAS), matéria da raiz seca (MRS), matéria total seca (MTS) e matéria dos nódulos seca (MNS). A temperatura na casa-de-vegetação durante a instalação até

o desmonte do experimento período variou entre 30,6 a 28,4°C, com média de 29,5°C.

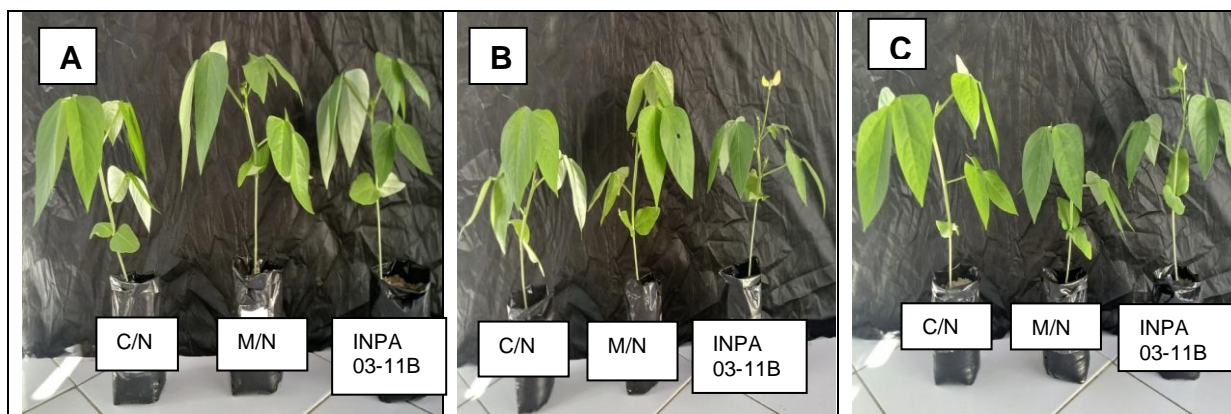
Com a verificação do efeito isolado do extrato de *C. heliotropiifolius* sobre as plantas inoculadas com a INPA 03-11B, houve a calibração do melhor volume de extrato e o quarto ensaio foi montado. Utilizou-se como substrato amostra de solo da classe Latossolo Amarelo distrófico (LAd), da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – Cruz das Almas – BA, coletado a 0,20 m de profundidade. As características químicas foram apresentadas conforme o seguinte resultado: pH (H<sub>2</sub>O): 6,1; P: 12 mg dm<sup>-3</sup>; K: 15 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ca: 18 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg: 0,98 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; (H+Al): 0,03 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Al: 0,0 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Na: 0,03; cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; SB: 45 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; CTC: 36 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; V: 68%; M.O: 15 g\Kg<sup>-1</sup>. Os tratamentos foram dispostos em DIC, em esquema fatorial (2x5), com sete repetições, sendo o primeiro fator constituído por volumes do extrato de *C. heliotropiifolius* diluído em 25% (v/v) (0,0 e 1,0 mL) e, o segundo fator as fontes de nitrogênio (três estirpes como inoculante: INPA 03-11B, UFRB FA34C2-2 e UFLA 03-84, uma adubação com N mineral (fonte uréia-45% N) com aplicação de 135 mg dm<sup>-3</sup> de N por vaso aos 15 dias após germinação (COSTA et al., 2014a) e, um tratamento sem inoculação e sem adubação nitrogenada como testemunha. Cinco sementes foram semeadas em vasos com capacidade de 3 dm<sup>-3</sup> higienizados com etanol 70%, e o desbaste foi realizado aos dez dias após emergência (DAE) ficando apenas uma planta por vaso. Efetuou-se irrigação diariamente com 100 mL de água em cada vaso para manter a 60% da capacidade de campo. Aos 42 dias após semeadura (estádio de floração), foram avaliadas os mesmos componentes de produção do ensaio anterior. A temperatura na casa de vegetação durante o período do experimento teve variação entre 40°C a 27 °C, com média de 29,16 °C.

Os dados obtidos do terceiro e quarto experimento foram submetidos à análise de variância e Teste de normalidade, por meio do Programa estatístico “R” (R Development Core Team, 2018). Em função do nível de significância foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro e no segundo ensaios houve germinação apenas para as sementes que não receberam volumes do extrato do *Croton heliotropiifolius*. Isto sugere que o uso de concentrações altas do extrato bruto ou diluído em 50% (v/v) de água, exerce um efeito herbicida em sementes de feijão-caupi, haja vista que afetou de forma negativa a germinação das sementes. Portanto, observa-se a importância de pesquisas posteriores, uma vez que, o uso do mesmo exerceu um efeito inibitório ao feijão-caupi.

No terceiro ensaio se obteve sucesso na calibração das concentrações do extrato de *C. heliotropiifolius* a serem aplicados no feijão-caupi, pois, houve germinação das sementes em todos os tratamentos com volumes de extrato, exceto para as plantas que receberam o volume de 1,5 mL do extrato, no qual a germinação fica desuniforme entre os tratamentos, inviabilizando a avaliação neste tratamento. A aplicação dos demais volumes de extrato teve efeito similar à testemunha, ou seja, não inibiu o crescimento da planta (Figura 1: A, B e C).



**Figura 1.** Plantas de feijão-caupi cultivadas em areia lavada autoclavada, com diferentes fontes de N e, volumes de extrato de *C. heliotropiifolius*. (A) 0 mL de extrato; (B) 0,5 mL de extrato; (C) 1,0 mL de extrato. (C/N): com 210 mg L<sup>-1</sup> N; (M/N): 105 mg L<sup>-1</sup> N; (INPA 03-11B): estirpe inoculante para o feijão-caupi.

Houve interação ( $p < 0,05$ ) entre as fontes de N e as doses de extrato para a Cla, Clb, Clt, (%VE), MPAS, MNS, MTS e (E%), com exceção da MSR ( $P > 0,05$ ).

A porcentagem de plântulas emergidas diferiu ( $p < 0,05$ ) apenas na fonte de 210 mg L<sup>-1</sup> de N na dose de 1,0 mL, sendo inferior a todos os demais tratamentos.

Em relação à %VE observa-se que a INPA 03-11B apresentou maior média No volume de 1,0 mL, tendo um acréscimo de 6,31% em relação ao controle (volume 0,0 mL). Além disso, na referida dose, a INPA 03-11B teve média superior aos demais tratamentos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Desdobramento da interação para as variáveis: percentagem de emergência (E%) e percentagem da velocidade emergência (%VE), clorofila *a* (CLA) *b* (CLB) e *total* (CLT), número de nódulos (NN), matéria da parte aérea seca (MPAS), matéria da raiz seca (MRS) e matéria total seca (MTS), matéria dos nódulos seca (MNS); das plantas de feijão-caupi cultivadas em areia lavada autoclavada, Cruz das Almas-BA, 2019.

<b>DOSES (mL)</b>						
<b>FONTE DE N</b>	<b>%E</b>			<b>%VE</b>		
	0,0	0,5	1,0	0,0	0,5	1,0
INPA 03-11B	80Aa	80Aa	80Aab	6,84Ba	5,75Cc	7,30Aa
210 mg L <sup>-1</sup> N	100Aa	95Aa	65Bb	6,89Aa	6,91Ab	6,14Bb
105 mg L <sup>-1</sup> N	90Aa	90Aa	100Aa	6,96Ba	7,30Aa	6,01Cb
<b>CV (%)</b>	17,48			2,83		
<b>FONTE DE N</b>	<b>CLA</b>			<b>CLB</b>		
	0,0	0,5	1,0	0,0	0,5	1,0
INPA 03-11B	42,26Aa	35,89Bb	42,85Aa	20,85Aa	13,20Bc	19,75Aa
210 mg L <sup>-1</sup> N	40,82Aa	44,40Aa	41,15Aa	17,50Bb	21,52Aa	19,00ABa
105 mg L <sup>-1</sup> N	42,75Aa	40,70Aa	41,87Aa	20,12ABab	17,17Bb	21,60Aa
<b>CV (%)</b>	6,13			9,59		
<b>FONTE DE N</b>	<b>CLT</b>			<b>NN<sup>1</sup></b>		
	0,0	0,5	1,0	0,0	0,5	1,0
INPA 03-11B	65,11Aa	49,07Bc	62,60Aa	63,25B	50C	75,25A
210 mg L <sup>-1</sup> N	58,32Ba	65,92Aa	60,65ABa	0	0	0
105 mg L <sup>-1</sup> N	62,87Aa	57,87Ab	63,47Aa	0	0	0
<b>CV (%)</b>	6,44			2,77		
<b>FONTE DE N</b>	<b>MPAS<sup>2</sup></b>			<b>MRS<sup>2</sup></b>		
	0,0	0,5	1,0	0,0	0,5	1,0
INPA 03-11B	1,89Bb	2,32ABa	2,90Aa	0,70ABc	0,62Bb	0,85Ab
210 mg L <sup>-1</sup> N	2,89Aa	2,89Aa	2,11Bb	1,54Aa	1,35Ba	1,17Ca
105 mg L <sup>-1</sup> N	2,45Ab	2,45Aa	2,51Aab	1,15Bb	1,50Aa	0,80Cb
<b>CV (%)</b>	15,83			9,39		
<b>FONTE DE N</b>	<b>MTS<sup>2</sup></b>			<b>MNS<sup>2</sup></b>		
	0,0	0,5	1,0	0,0	0,5	1,0
INPA 03-11B	2,60Bb	2,94ABb	3,69Aa	0,63B	0,23A	0,26A
210 mg L <sup>-1</sup> N	4,04Aa	3,75Aab	3,50Aa	0	0	0
105 mg L <sup>-1</sup> N	3,19Aab	3,94Aa	3,11Aa	0	70	0
<b>CV (%)</b>	14,33			1,32		

\*Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). <sup>1</sup>Raiz planta<sup>-1</sup>; <sup>2</sup>g planta<sup>-1</sup>.



Na avaliação da CLA (Tabela 1), observa-se que não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre as plantas de feijão-caupi cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio e doses de extrato, exceto quando inoculadas com a estirpe INPA 03-11B no volume de 0,5 mL do extrato. Neste tratamento, houve um decréscimo das médias, que, provavelmente pode ter sido atribuído a algum composto químico que estava livre na solução e influenciou de forma negativa a eficiência das bactérias na absorção de N. Ao aumentar a dose para 1,0 mL, o composto foi complexado em solução e as bactérias diazotróficas voltaram a promover maior acúmulo de N nas folhas, uma vez que, o N é essencial a molécula de clorofila (COELHO et al., 2012), e baixas concentrações de clorofilas indicam deficiência de N na planta (CARDOSO et al., 2011). Para as variáveis CLB e CLT não se observa diferença entre as fontes de N e a maior dose de extrato estudada, e o comportamento da estirpe INPA 03-11B com 1,0 mL de extrato é similar a testemunha sem extrato, ou seja, o mesmo não interfere de forma negativa na síntese de fotoassimilados de plantas de feijão-caupi, inoculadas com a INPA 03-11B ou tratadas com doses de N.

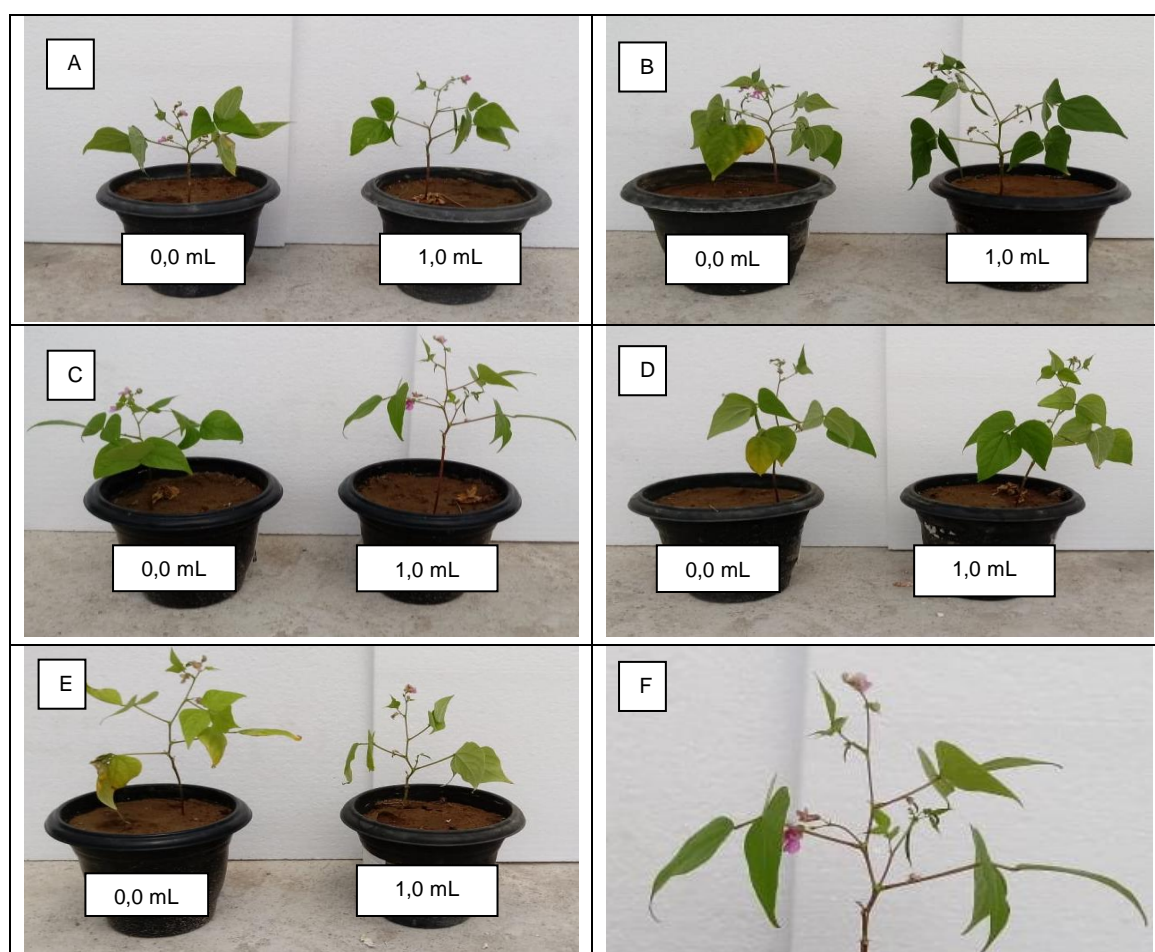
O uso de 1,0 mL do extrato com o inoculante promoveu aumento na MPAS, MRS, MTS e MNS em relação às demais doses (Tabela 1). Deste modo, evidencia-se que a aplicação das doses de extrato do *C. heliotropiifolius*, nas condições testadas, não tem efeito negativo no inóculo da INPA 03-11B, que reconhecidamente na literatura promove um ganho de matéria seca, acúmulo de nitrogênio e produção da cultura do feijão-caupi (ALCÂNTARA et al., 2014; COSTA et al., 2014; MARINHO et al., 2017).

Em relação às plantas adubadas com  $210 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrogênio em solução nutritiva (TABELA 1), verifica-se que não há diferença ( $P > 0,05$ ) entre a testemunha (sem extrato) e os volumes de extrato para a CLA e MTS. As plantas apresentaram menor produção de MPAS e MRS, e menor (%E) na dose de 1,0 mL. Para a CLB as plantas tratadas com volumes do extrato tiveram média superior à testemunha. Para a (%VE) a testemunha foi superior ao volume de 1,0 mL. Constatou-se nenhuma nodulação nos tratamentos com aplicações de N, o que confirma não ter havido contaminação nos tratamentos. Ao se comparar as plantas que receberam aplicação de  $105 \text{ mg L}^{-1}$  de N, observa-se que não houve diferença entre a testemunha e os volumes de extrato para a %E, CLA, CLT, MPAS e MTS. Esses resultados reforçam que a aplicação do extrato diluído em 25% (v/v) de água no volume de 1,0 mL não prejudica o crescimento das plantas de feijão-caupi.

Com os resultados do terceiro ensaio apresentados na Tabela 1, verificou-se que a inoculação com a estirpe INPA 03-11B em interação com o extrato de *C. heliotropiifolius* diluído em 25% (v/v) no volume de 1,0 mL incrementou as seguintes variáveis em relação à testemunha: MPAS, MTS, MNS, %VE e NN, em 34,86%; 29,54%; 39,41%; 6,31% e 15,94%, respectivamente. Assim, mediante os resultados, pode-se assegurar que, o uso de 1,0 mL do extrato diluído em 25% (v/v) não prejudicou a germinação, crescimento, nodulação e a eficiência do processo de FBN em plantas de feijão-caupi inoculadas com a estirpe INPA 03-11B.

No quarto ensaio buscou-se validar os resultados, uma vez que no ambiente solo não se tem o controle dos microorganismos presentes. Busca-se ao usar o extrato controlar patógenos ocorrentes no solo e que afetam o crescimento inicial do feijão-caupi, como uma alternativa sustentável de manejo agroecológico, e que ao mesmo tempo não proporcione um efeito negativo nas bactérias diazotróficas de eficiência já comprovada para a cultura.

O uso do extrato na dose de 1,0 mL não prejudicou o crescimento das plantas de feijão-caupi cultivadas em solo com diferentes fontes de nitrogênio (Figura 2).



**Figura 2.** Plantas de feijão-caupi cultivadas em solo Latossolo Amarelo distrófico (Lad), com diferentes fontes de N e volumes de extrato (mL) de *C. heliotropiifolius*. (A) Sem nitrogênio (testemunha); (B) Adubação com N mineral; (C) Estirpe INPA 03-11B; (D) Estirpe UFLA 03-84; (E) Estirpe UFRB FA34C2-2; (F) Floração do feijão-caupi.

Houve interação ( $P < 0,05$ ) entre os volumes do extrato de *C. heliotropiifolius* e as fontes de N. O comportamento das estirpes variou em função da presença e ausência do extrato (Tabela 2).

**Tabela 2.** Desdobramento da interação para as variáveis: clorofila A (CLA), B (CLB)

DOSES (mL)
------------

e TOTAL (CLT); matéria da parte aérea seca (MPAS), raiz (MRS) e total (MTS); número de nódulos (NN) e de folhas (NF) e, matéria dos nódulos dos nódulos (MNS) das plantas de feijão-caupi cultivadas em Latossolo Amarelo distrófico.

FONTE DE N	CLA		CLB	
	0,0	1,0	0,0	1,0
INPA 03-11B	23,41Bbc	29,84Ab	6,64Bb	8,42Ab
Com N	29,84Ba	33,62Aa	9,28Ba	11,20Aa
UFRBFA34C2-2	22,02Abc	21,77Ad	6,44Ab	6,22Ac
Testemunha	25,28Ab	25,65Ac	7,01Ab	7,92Abc
UFLA 03-84	21,05Bc	27,15Abc	5,42Bb	8,12Ab
<b>CV (%)</b>	8,5		14,97	
FONTE DE N	CLT		NN <sup>1</sup>	
	0,0	1,0	0,0	1,0
INPA 03-11B	30,05Bbc	38,27Ab	11,42Bb	19,28Ab
Com N	39,12Bc	44,82Aa	14,85Bb	18,57Ab
UFRB FA34C2-2	28,47Acb	28,0Ad	23,71Aa	24,28Aa
Testemunha	32,30Ab	33,58Ac	5,71Bc	12,14Ac
UFLA 03-84	26,48Bc	35,28Abc	21,28Aa	19,00Bb
<b>CV (%)</b>	8,95		3,85	
FONTE DE N	MPAS <sup>2</sup>		MRS <sup>2</sup>	
	0,0	1,0	0,0	1,0
INPA 03-11B	0,97Ab	0,93Ac	0,44Aab	0,40Ab
Com N	1,48Aa	1,51Aa	0,45Aab	0,42Ab
UFRB FA34C2-2	0,98Ab	0,83Bc	0,50Aa	0,43Bb
Testemunha	1,01Bb	1,91Ab	0,45Bab	0,63Aa
UFLA 03-84	0,93Ab	0,91Ac	0,38Ab	0,41Ab
<b>CV (%)</b>	10,42		14,40	
FONTE DE N	MTS <sup>2</sup>		MSN <sup>2</sup>	
	0,0	1,0	0,0	1,0
INPA 03-11B	1,41Ab	1,33Ab	0,85Aa	0,84Aa
Com N	1,94Aa	1,94Aa	0,84Aa	0,85Aa
UFRB FA34C2-2	1,50Ab	1,27Bb	0,84Aa	0,85Aa
Testemunha	1,47Bb	1,82Aa	0,84Aa	0,85Aa
UFLA 03-84	1,31Ab	1,32Ab	0,85Aa	0,85Aa
<b>CV (%)</b>	8,7		0,23	

\*Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). <sup>1</sup>Raiz planta<sup>-1</sup>; <sup>2</sup>g planta<sup>-1</sup>.

Na avaliação das clorofilas A, B e TOTAL a fonte com adubação mineral apresentou maior média, tanto na ausência como na presença do extrato em relação aos demais tratamentos. Já as plantas inoculadas com estirpes INPA 03-11B e UFLA 03-84 em interação com o extrato tiveram acréscimo no teor das clorofilas, o que mostra benefício desta interação na síntese de fotoassimilados. A estirpe UFRB FA34C2-2 e a testemunha (bactérias nativas do solo) mantiveram o mesmo comportamento.

Quanto à MPAS (Tabela 2), o tratamento com N mineral foi superior aos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ) tanto na presença, como na ausência do extrato. A INPA 03-11B e a UFLA 03-84 não mudou seu comportamento nos diferentes volumes de extrato. A estirpe UFRB FA34C2-2 teve menor incremento da MPAS no volume de 1,0 mL, enquanto que, a testemunha teve maior incremento neste

volume. Para a MRS observa-se que sem o extrato, a UFRB FA34C2-2 teve média superior a UFLA 03-84 não diferindo das outras fontes. Já com o uso do extrato, a testemunha teve maior incremento, em relação aos demais. Na avaliação da MTS, a fonte com N mineral teve maior média sem adição de extrato. No volume de 1,0 mL, a mesma juntamente com a testemunha teve maior incremento. Já a UFRB FA34C2-2 apresentou um pequeno decréscimo no volume de 1,0 mL, e a INPA 03-11B e UFLA 03-84 não tiveram alteração.

As plantas de feijão-caupi inoculadas com as estirpes UFRB FA34C2-2 e UFLA 03-84 apresentaram maior NN na ausência do extrato de *C. heliotropiifolius* em comparação as demais fontes de N, na presença do extrato somente a UFRB FA34C2-2 manteve-se superior aos demais (Tabela 2).

Quanto a MSN, observa-se que não houve diferença entre todos os tratamentos, tanto na ausência como na presença do uso do extrato e *Croton heliotropiifolius* (Tabela 2).

As estirpes INPA 03-11B e UFLA 03-84, reconhecidamente por meio da FBN beneficiam a cultura do feijão-caupi com rendimento de grãos significativos (LACERDA et al, 2004; ZILLI et al., 2009; COSTA et al, 2014; ), constituindo-se como um processo muito importante para a cultivo da mesma, por apresentar baixo custo de produção (ZILLI et al., 2009), além de assumir caráter ecológico.

Não se pode atribuir os efeitos verificados nas plantas de feijão-caupi somente aos compostos bioativos como os flavonoides presentes no extrato, mas, pode-se assegurar que os 12 compostos identificados (Kaempferol, catequina, ácido gálico, quercetina, ácido vanílico, ácido elágico, ácido cafeico, ácido trans-cinâmico, ácido p-cumárico, ácido siríngico, ácido ferúlico e ácido clorogênico, entre outros que não foram identificados) no extrato de *Croton heliotropiifolius* (SOUSA, 2020) não afetaram de forma negativa a cultura. Além de que, o ácido elágico composto majoritário do extrato promoveu um efeito protetor nas sementes, sendo o extrato um produto natural promissor para a cultura do feijão-caupi.

Foi constatado pelos resultados apresentados neste estudo, que o uso do extrato de *Croton heliotropiifolius* (SOUSA, 2020), diluído em 25% (v/v) de água até o volume de 1,0 mL, não prejudicou a eficiência das estirpes em fixar o N, nem a germinação, crescimento e nodulação da cultura do feijão-caupi (Figura 2). Neste contexto, o extrato poderá ser usado em futuros testes com plantas de feijão-caupi inoculadas, a fim de controlar ou prevenir doenças na cultura que são causadas por

patógenos de solo que geram infecções, de modo a não prejudicar a eficiência da estirpe INPA 03-11B, UFLA 03-84 e UFRB FA34C2-2, haja vista que, as mesmas promovem maiores rendimentos de grãos de feijão-caupi (LACERDA et al., 2004; ZILLI et al., 2009; GUALTER et al., 2011; COSTA et al., 2014).

## CONCLUSÃO

O emprego do extrato de *Croton heliotropiifolius* diluído em 25% (v/v) de água até a dose de 1,0 mL, não afeta negativamente a germinação, nodulação e crescimento de feijão-caupi, inoculados com estirpes inoculantes e também nodulado com rizóbios nativos do solo.

O extrato de *C. heliotropiifolius* bruto ou diluído em 50% (v/v) de água, tem efeito herbicida em sementes de feijão-caupi Epace 10.

## REFERÊNCIAS

- ALBINO, U. B.; CAMPO, R. J. Efeito de fontes e doses de molibdênio na sobrevivência do *Bradyrhizobium* e na fixação biológica de nitrogênio em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 527-534, 2001. DOI.org/10.1590/S0100-204X2001000300018.
- ALCÂNTARA, R. M. C. M.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; ROCHA, M. M; E CARVALHO, J. S. Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares brasileiras de feijão-caupi. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 1, p. 1-9, 2014. ISSN: 1806-6690.
- ALENCAR FILHO, J. M. T.; ARAÚJO, L. C.; OLIVEIRA, A. P.; GUIMARÃES, A. L.; PACHECO, A. G. M.; SILVA, F. S.; CAVALCANTI, L. S.; LUCHESEC, A. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; ARAÚJO, E. C. C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 440-444, 2017. DOI.org/10.1016/j.bjp.2017.02.004.
- AQUINO, V. V. F.; COSTA, J. G. M.; ANGÉLICO, E. C.; MEDEIROS, R. S.; ARAÚJO, M. F.; RODRIGUES, O. G. Metabólitos secundários e ação antioxidante de *Croton heliotropiifolius* e *Croton blanchetianus*. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p. 7-10, 2017. DOI.org/10.22571/Actabra13201730.

BRITO, S. S. S.; SILVA, F.; MALHEIRO, R.; BAPTISTA, P.; PEREIRA, J. A. *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. **Industrial Crops & Products**, v. 113, p. 308-315, 2018. DOI.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.044.

BRASIL. **Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011 anexo** – protocolo oficial para avaliação da viabilidade e eficiência agrônômica de cepas, inoculantes e tecnologias relacionados ao processo de fixação biológica de nitrogênio em leguminosas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, nº 58 de 25 mar. 2011.

CARDOSO, A. D.; ALVARENGA, M.A.R.; MELO, T.L.; SILVEIRA VIANA, A.E. & MATSUMOTO, S.N. Índice SPAD no limbo foliar da batateira sob parcelamento e doses de nitrogênio e potássio. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 1, p. 159-167, 2011.

CHAGAS JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, A. G.; SANTOS, G. R.; REIS, A. F. B.; CHAGAS, L. F. B. Promoção de crescimento em feijão-caupi inoculado com Rizóbio e *trichoderma* spp. no cerrado. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 3, p. 190-199, 2014. ISSN 1983-2125.

CHEN, G-L.; FAN, M-X.; WU, J-L.; LI, NA.; GUO, M-Q. Antioxidant and anti-inflammatory properties of flavonoids from lotus plumule. **Food Chemistry**, v. 277, p. 706-712, 2019. DOI.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.040.

COELHO, F. S.; FONTES, P. C. R.; FINGER, F. L.; CECON, P. R. Avaliação do estado nutricional do nitrogênio em batateira por meio de polifenóis e clorofila na folha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 4, p. 584-592, 2012. DOI.org/10.1590/S0100-204X2012000400015.

COOPER, J. E. Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. **Advances in Botanical Research**, v. 41, 62 p, 2004. DOI.org/10.1016/S0065-2296(04)41001-5.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; FERREIRA, L. V. M.; AMARAL, F. H. C.; NPOBREGA, J. C. A.; SILVA, A. F. T.; MOREIRA, F. M. S. Crescimento e produtividade de feijão-caupi cultivar BRS Guariba inoculado com estirpes de rizóbio no sudoeste do Piauí. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3073-3084, 2014a. DOI: 10.5433/1679-0359.2014v35n6p3073.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; SILVA, A. F. T.; FERREIRA, L. V. M.; NÓBREGA, J. C. A.; MOREIRA, F. M. S. Resposta de duas cultivares de feijão-caupi à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 4, p. 489-494, 2014b. DOI:10.5039/agraria.v9i4a3590

COSTA, E. M.; CARVALHO, T. S.; GUIMARÃES, A. A.; LEÃO, A. C. R. CRUZ, L. M.; BAURA, V. A.; LEBBE, L.; WILLEMS, A.; MOREIRA, F. M. S. Classification of the inoculant strain of cowpea UFLA03-84 and of other strains from soils of the Amazon region as *Bradyrhizobium viridifuturi* (symbiovar tropici), **Brazilian Journal of Microbiology**, 2019. DOI:https://doi.org/10.1007/s42770-019-00045-x.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 10, p. 1023-1029, 2013. DOI.org/10.1590/S1415-43662013001000001.

FIDELIS, R. R.; FERNANDES, P. S. M.; MOREIRA, E. R.; TAVARES, T. C. O. Identificação de genótipos de feijoeiro comum tolerantes ao alumínio. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 5, n. 4, p. 26-33, 2018. ISSN 2358-6303.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E.V. Feijão-caupi no Brasil : produção, melhoramento genético, avanços e desafios. –Teresina, PI: **Embrapa Meio-Norte**, 2011. 84 p. : il. ; 27 cm. ISBN 978-85-88388-21-5.

GOPALAKRISHNAN, S.; SRINIVAS, V.; SAMINENI, S. Nitrogen fixation, plant growth and yield enhancements by diazotrophic growth-promoting bacteria in two cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 116-123, 2017. DOI.org/10.1016/j.bcab.2017.06.012.

GUALTER, R. M. R.; BODDEY, R. M.; RUMJANEK, N. G.; ANTÔNIO CARLOS REIS DE FREITAS, A. C. R.; XAVIER, G. R. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia Maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 3, 2011. DOI.org/10.1590/S0100-204X2011000300011.

HASSAN, S.; MATHESIUS, U. The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 9, p. 3429-3444, 2012. DOI:10.1093/jxb/err430.

IBRO, G.; SORGHO, M. C.; IDRIS, A. A.; MOUSSA, B.; BARIBUTSA, D.; Lowenberg-DeBoer, J. Adoption of cowpea hermetic storage by women in Nigeria, Niger and Burkina Faso. **Journal of Stored Products Research**, v. 58, p. 87-96, 2014. DOI.org/10.1016/j.jspr.2014.02.007.

KHALID, M.; RAHMAA, S.; BILAL, M.; DAN-FENG, H. Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens-A review. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 18, n. 1, p. 211-230, 2019. DOI.org/10.1016/S2095-3119(19)62555-4

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, ed. 4, 663 p., 2005.

LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi, **Revista Ceres**, v. 51, n. 293, p. 67-82, 2004.

LINHARES, C. M. S.; FREITAS, F. C. L.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; CUZ, B. L. S.; DANTAS, A. M. M. Efeito de coberturas do solo sobre a sobrevivência de



*Macrophomina phaseolina* no feijão-caupi. **Summa phytopathol**, v. 42, n. 2, p. 155-159, 2016. DOI.org/10.1590/0100-5405/2104.

MARINHO, R. C. N.; FERREIRA, L. V. M.; SILVA, A. F.; MARTINS, L. M. V.; NÓBREGA, R. S. A.; FERNANDES-JÚNIO, P. I. Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. **Bragantia**, v. 76, n. 2, p. 273-281, 2017. DOI.org/10.1590/1678-4499.003.

MENDONÇA, C. A.; BARROSO NETO, A. M.; HERMÍNIA, C.; BERTINI, C. M.; AMORIM, M. Q.; ARAÚJO, L. B. A. Caracterização fenológica associada a graus-dia em genótipos de feijão-caupi para produção de grãos verdes. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 11 n. 21; p. 485-492, 2015.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: ed. UFLA, 2008.

MUS, F.; CROOK, M. B.; GARCIA, K.; COSTAS, A. G.; GEDDES, B. A.; KOURI, E. D.; PARAMASIVAN, P.; RYU, M.H.; OLDROYD, G. E. D.; POOLE, P. S.; UDVARDI, M. K.; VOIGT, C. A.; ANE, J-M.; PETERS, J. W. Symbiotic nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, 2016. DOI: 10.1128/AEM.01055-16.

NABAVI, S. M.; et al. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. **Biotechnology Advances**, v. 38, p. 12, 2020. DOI.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.005.

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Efeito do inóculo, período de molhamento foliar e do estágio fenológico do feijão-caupi no desenvolvimento da mela. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 2, p. 104-109, 2011. DOI.org/10.1590/S1982-56762011000200006.

OMOMOWO, I. O.; FADIJI, A. E.; OMOMOWO, O. I. Assessment of bio-efficacy of *Glomus versiforme* and *Trichoderma harzianum* inhibiting powdery mildew disease and enhancing the growth of cowpea. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 63, p. 9-17, 2018. DOI.org/10.1016/j.aoas.2018.03.001.

QUEIROZ, M. M. F.; QUEIROZ, E. F.; ZERAIK, M. L.; MARTI, G.; FAVRE-GODAL, Q.; SIMÕES-PIRES, C.; MARCOURT, L.; CARRUPT, P. A.; CUENDET, M.; PAULO, M. Q.; BOLZANI, V. S.; WOLFENDER, J. L. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. **Phytochemistry Letters**, v. 761, n of, 2014. DOI.org/10.1016/j.phytol.2014.08.013.

R CORE TEAM (2018). R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RASCIO, N; ROCCA, N. L. Biological Nitrogen Fixation, **Encyclopedia of Ecology**, 2nd edition, v. 2, 2013. DOI.10.1016/B978-0-444-63768-0.00685-5.

RODRIGUES, O. G.; ANGÉLICO, E. C.; COSTA, J. G. M.; LUCENA, M. F. A.; QUEIROGA NETO, V.; SILVA, W. W. Avaliação da atividade antioxidante dos

extratos botânicos de *Croton Heliotropiifolius* Kunth. e *Croton blanchetianus* Baill: Resultados Preliminares. **ACSA**, v. 12, n. 3, p. 237-241, 2016. DOI. org/10.30969/acsa.v12i3.700.

SECCO, R. S.; INÊS CORDEIRO, I.; SENNA-VALE, L.; SALES, M. F.; LIMA, L. R.; MEDEIROS, D.; HAIAD, B. S.; OLIVEIRA, A. S.; CARUZO, M. B. R.; Carneiro-Torres, D.; Bigio, N. C. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae s.l. in Brazil, **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 227-242, 2012. DOI.org/10.1590/S2175-78602012000100014.

SILVA, C. F.; MOURA, M. F.; VILELA, A. R. R.; ARAÚJO, M. B.; MARQUES, J. D. S. Produção de feijão-caupi em função do emprego de inoculante e adubos orgânicos e mineral. **DIVERSITAS JOURNAL**. v. 4, n. 3, p. 1130-1145, 2019. DOI:10.17648/diversitas-journal-v4i3.832.

SILVA, J. A. G.; LIMA, I. R.; SANTANA, M. A. N.; SILVA, T. M. S.; SILVA, M. I. A.G.; LEITE, S. P. Screening Fitoquímico e Avaliação da Toxicidade de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae) frente à *Artemia salina* Leach. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 934-941, 2017.

SILVA, L. B.; SILVA, J. C.; PAVAN, B. E.; PEREIRA, F. F.; MAGGIONI, K.; ANDRADE, L. H.; CANDIDO, A. C. S. PERES, M. T. L. P. Insecticide irritability of plant extracts against *Sitophilus zeamais*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n.11, p. 978-983, 2013. DOI 10.5897/AJAR12.1849.

SILVA, L. B.; TORRES, E. B.; SILVA, K. F.; SOUZA, J.S.N.; LOPES, M.S.; ANDRADE, L.H.; XAVIER, Z. F. Toxicity of Ethanolic Extract of *Croton heliotropiifolius* in Weevil Populations of Stored Maize Grains. **Journal of Entomology**, v. 9, n. 6, p. 413-421, 2012. DOI: 10.3923/je.2012.413.421.

SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F. A.; CARDOSO, E. J. B. N. **Micorrizas: 30 anos de historia no Brasil**, Lavras: UFLA, 716 p., 2010.

SOUSA, C. B. C. **Otimização da extração de compostos fenólicos em *Croton heliotropiifolius* e aplicação do extrato no cultivo do feijão-caupi**. 2020. 61 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Qualidade de Ecossistemas) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas, 2020.

SOUSA, J. X. **Promoção do crescimento vegetal por bactérias oriundas de solos com histórico de deposição de manipueira**. 2017. 61 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Qualidade de Ecossistemas) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas, 2017.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazônia**, v. 39, n. 4, p. 749-758, 2009. DOI.org/10.1590/S0044-59672009000400003.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de extração assistida por ultrassom é eficiente na extração dos compostos fenólicos (Kaempferol, catequina, ácido gálico, quercetina, ácido vanílico, ácido elágico, ácido cafeico, Ácido trans-cinâmico, ácido p-cumárico, ácido siríngico, ácido ferúlico e ácido clorogênico) presentes em folhas de *Croton heliotropiifolius* e, o planejamento Doehlert é uma ferramenta competente na otimização das melhores condições de extração de flavonoides totais da espécie.

O extrato bruto de *Croton heliotropiifolius* nas condições estudadas apresenta-se como um produto natural promissor para a cultura do feijão-caupi. O emprego do extrato diluído em 25% (v/v) de água destilada, no volume de 1,0 mL, incrementou o número de nódulos de plantas de feijão-caupi cultivadas em areia lavada e autoclavada. O uso do extrato não prejudicou a fixação biológica de nitrogênio em plantas de feijão-caupi cultivadas em solo. Com isso, surge à possibilidade de se obter um produto natural que apresente eficiência no controle de patógenos de solo e sementes que causam doenças em plantas de feijão-caupi, sendo necessários futuros testes.

