

PLANEJAMENTO FATORIAL PARA AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES E COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE FOLHAS DE MORINDA CITRIFOLIA L

FACTORIAL DESIGN TO PHYTOCHEMICAL EVALUATION AND QUANTIFICATION OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC COMPOUNDS IN HYDROETHANOLIC LEAF EXTRACTS OF MORINDA CITRIFOLIA L

Isnara Silva Holanda¹
Franciany Costa do Carmo²
Francisco Iuri da Silva Martins³
Luanne Eugênia Nunes⁴
Marcelo Vítor de Paiva Amorim⁵

RESUMO: A *Morinda citrifolia* (L.) é uma planta medicinal da família Rubiaceae, cujo um número elevado de atividades farmacológicas tem sido relatado nos extratos dos frutos, folhas e raízes, tais como analgésico, anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora. O trabalho teve como objetivo avaliar mediante um planejamento fatorial, quais alterações garantiriam uma melhor obtenção de quantidade de flavonoides, compostos fenólicos e avaliação fitoquímica em extratos hidroetanólicos das folhas de *Morinda citrifolia* (L). O planejamento foi realizado no software STATISTICA® e resultou em 15 amostras diferentes, com tamanhos de folhas (até 10 cm, entre 10 e 20 cm e entre 20 e 30 cm), proporção de solução extratora (10%, 30% e 50% etanólica) e tempo de extração (30, 60 e 120min), todas realizadas à 75 °C em ultrassom. A avaliação fitoquímica qualitativa foi realizada por métodos colorimétricos e de precipitação, similares em todas as amostras, nas quais revelaram a presença de saponinas, antraquinonas, alcaloides e esteroides e triterpenos. A quantificação de flavonoides variou entre 21,5 a 74,7 mg de EQ/100g de extrato. O planejamento fatorial revelou que a melhor condição para flavonoides foi de 10cm:50%:30 min. A quantidade de compostos fenólicos variou entre 34,9 a 76,7 mg de EAG/100g de amostra, com melhores condições para 10cm:10%:60min. Esses resultados indicam que a depender do interesse do composto a ser extraído, condições experimentais devem ser adequadas à necessidade.

Palavras-chave: Fenólicos. Flavonoides. Planejamento fatorial. *Morinda citrifolia* L.

¹ Farmacêutica pela Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB/CE. <https://orcid.org/0009-0003-6590-0085>

² Farmacêutica pela Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB/CE. <https://orcid.org/0000-0002-7809-2908>

³ Farmacêutico pela Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB/CE. Doutorando pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará - UECE/CE. <https://orcid.org/0000-0003-3524-5609>

⁴ Farmacêutica. Doutora em Ciências Farmacêuticas pela UFPE. Professora do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB/CE. <https://orcid.org/0000-0001-6524-0994>

⁵ Farmacêutico. Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos pela UFRN. Professor do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB/CE e orientador do trabalho.

ABSTRACT: *Morinda citrifolia* (L.) is a medicinal plant from the Rubiaceae family, whose fruit, leaves, and root extracts have been reported to have many pharmacological activities, such as analgesic, anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory. The aim of this study was to evaluate, by means of a factorial design, which alterations would guarantee the best number of flavonoids, phenolic compounds, and phytochemical evaluation in hydroethanolic extracts of *Morinda citrifolia* (L) leaves. The planning was carried out using STATISTICA software resulted in 15 different samples, with different leaf sizes (up to 10 cm, between 10 and 20 cm and between 20 and 30 cm), extractant solution ratios (10%, 30% and 50% ethanol) and extraction times (30, 60 and 120 minutes), all carried out at 75 °C using ultrasound. The qualitative phytochemical evaluation was carried out using colorimetric and precipitation methods, which were similar for all the samples, revealing the presence of saponins, anthraquinones, alkaloids and steroids and triterpenes. The quantification of flavonoids ranged from 21.5 to 74.7 mg of QE/100g of extract. Factorial planning revealed that the best condition for flavonoids was 10cm:50%:30 min. The quantity of phenolic compounds ranged from 34.9 to 76.7 mg of GAE/100g of extract, with the best conditions being 10cm:10%:60min. These results indicate that, depending on the interest of the compound to be extracted, experimental conditions should be adapted to the need.

Keywords: Phenolic. Flavonoids. Factorial design. *Morinda citrifolia* L.

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, as plantas medicinais têm sido utilizadas por populações de todos os continentes no tratamento de diversas enfermidades, sendo amplamente referenciadas na medicina popular por suas propriedades farmacológicas. Essas aplicações tradicionalmente motivam a busca por princípios ativos e o desenvolvimento de pesquisas científicas destinadas a comprovar sua segurança, eficácia e qualidade (Veiga; Pinto; Maciel, 2020).

Diversos estudos demonstram que metabólitos vegetais exercem variados efeitos terapêuticos (Phosrithong; Nuchtavorn, 2016; Remila *et al.*, 2015), destacando-se, entre eles, as ações anti-inflamatórias. O potencial efeito anti-inflamatório de diferentes compostos naturais é evidenciado pelo controle de elementos-chave envolvidos no desenvolvimento do processo inflamatório, por meio da modulação de mediadores inflamatórios (Souza *et al.*, 2017).

Morinda citrifolia (L.), popularmente conhecida como Noni, é uma planta medicinal pertencente à família Rubiaceae, a qual compreende aproximadamente 60 variedades de plantas distribuídas em regiões tropicais da África, Austrália e Ásia. As folhas, quando preparadas na forma de infusão, são tradicionalmente recomendadas para o alívio de náuseas, febre, tosse, diarreia, disenteria, verminoses intestinais, cólicas menstruais e arteriosclerose (SETIC, 2020).

Diversos constituintes já foram identificados nos frutos de *M. citrifolia* (L.), os quais apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, cardioprotetoras e hepatoprotetoras. Dentre esses compostos, destacam-se 3,3'-bisdimetilpinoresinol, americanol

A, americanina A, morindolina, isoprincepina, neolignina, kaempferol, quercetina, rutina, catequina e epicatequina (Wang *et al.*, 2008). Vários estudos químicos foram conduzidos com essa espécie, resultando na identificação de diferentes classes de metabólitos e de uma ampla variedade de compostos, incluindo flavonoides, compostos fenólicos, iridoides, cumarinas, antraquinonas e terpenóides (Gomes, 2021).

Entre os diferentes métodos de planejamento experimental, o planejamento fatorial se destaca por permitir a análise simultânea do impacto de múltiplas variáveis, utilizando um número reduzido de experimentos quando comparado a métodos que avaliam variáveis de forma isolada (Peralta-Zamora; Moraes; Nagata, 2005).

Com base nos achados da literatura e em seu uso tradicional pelas populações, este projeto teve como objetivo avaliar, por meio de planejamento fatorial, quais alterações proporcionariam uma melhor resposta em termos do teor de flavonoides e compostos fenólicos, bem como realizar a avaliação fitoquímica de extratos hidroetanólicos das folhas de *Morinda citrifolia* (L.).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras

As folhas de *Morinda citrifolia* (L.) foram coletadas na Fazenda Experimental de Piroás da UNILAB, localizada na região do Maciço de Baturité, nas coordenadas 25°03'15.7" S e 50°08'02.9" W, no período da manhã, sob temperatura de 25 °C, no município de Redenção-CE, em fevereiro de 2024. As folhas coletadas encontravam-se completamente expandidas, com pecíolo, isentas de pragas e doenças, e provenientes do mesmo indivíduo vegetal. O material coletado foi imediatamente transportado para o Laboratório de Microbiologia da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Campus das Auroras, onde foi prontamente higienizado. Em seguida, as amostras foram desidratadas em estufas a 50 °C por 24 horas.

Após a secagem, as folhas foram trituradas em almofariz e pistilo e peneiradas, de modo a obter uma amostra com tamanho de partícula inferior a 0,71 mm de diâmetro. Posteriormente, foram armazenadas protegidas da luz, em tubos Falcon envoltos em papel-alumínio, e mantidas à temperatura de -6 °C até o momento das análises.

2.2. Planejamento fatorial

Os experimentos foram conduzidos utilizando o Planejamento Composto Central (Central Composite Design – CCD), abordagem amplamente empregada em experimentos de superfície de resposta (Response Surface Methodology – RSM). O objetivo do CCD é modelar e otimizar processos que envolvem múltiplos fatores ou variáveis independentes, auxiliando na determinação das condições ótimas de um sistema ou processo (Montgomery, 2019).

O CCD combina três tipos de pontos no espaço experimental: pontos fatoriais, axiais e centrais. Os pontos fatoriais correspondem às combinações máximas e mínimas dos níveis de cada fator, fornecendo informações sobre os limites da região de interesse. Os pontos axiais estendem-se além dos pontos fatoriais, permitindo uma exploração mais abrangente das variáveis do experimento. Por fim, os pontos centrais são repetidos com o objetivo de avaliar a variabilidade do sistema e aumentar a precisão do modelo, possibilitando o ajuste de uma superfície de resposta quadrática (Myer; Montgomery; Anderson-Cook, 2016).

Para tanto, foram consideradas as seguintes variáveis independentes: tamanho das folhas (16 g de folhas com comprimento de até 10 cm, de 10 a 20 cm e de 20 a 30 cm), proporção do solvente extrator hidroetanólico (10% v/v, 30% v/v e 50% v/v) e tempo de extração (30, 60 e 120 min). O software STATISTICA, versão 10, utilizando a ferramenta Experimental Design, foi empregado para a construção do planejamento experimental.

2.3. Extração das amostras

De acordo com o planejamento fatorial, o software STATISTICA® determinou um total de 15 amostras (Tabela 1), as quais apresentaram características distintas conforme cada variável independente avaliada: tamanho de folha, proporção do solvente extrator e tempo de extração.

Tabela 1: Condições experimentais para os extratos de *M. citrifolia* (L.)

Amostras	Tamanho (mm)	Etanol (%)	Tempo de Extração (min)
1	10	10	30
2	10	10	120
3	10	50	30
4	10	10	120
5	10	10	60
6	20	10	60
7	20	50	60
8	20	30	30

9	20	30	120
10	20	30	60
11	30	30	30
12	30	50	120
13	30	50	30
14	30	50	120
15	30	30	60

Uma massa de 500 mg de cada amostra foi pesada e acondicionada em tubos Falcon, de acordo com a metodologia descrita por Schafranski *et al.* (2019), com algumas adaptações, contendo 25 mL de solvente extrator, conforme cada condição experimental. Em seguida, as amostras foram submetidas a banho ultrassônico a 75 °C e retiradas de acordo com o tempo de extração estabelecido para cada ensaio. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo Falcon. Após a obtenção dos extratos, as amostras foram armazenadas sob refrigeração, entre 2 e 8 °C, até o momento das análises. Foram realizadas a avaliação fitoquímica de cada extrato, bem como a quantificação total de flavonoides e de compostos fenólicos.

2.4. Triagem fitoquímica

5

A triagem dos metabólitos secundários foi realizada por meio de ensaios qualitativos, colorimétricos e de precipitação, conforme descrito por Harborne (1998). As amostras foram analisadas quanto à presença de taninos (reações com gelatina e cloreto férrico a 1%), alcaloides (reação de Dragendorff), flavonoides (reações de Tauböck, Shinoda e cloreto de alumínio), saponinas (índice de espuma ou ensaio afrosimétrico), cumarinas (fluorescência sob luz UV após adição de NaOH a 10%), antocianinas (teste diferencial de pH), esteroides e triterpenoides (reação de Liebermann–Burchard) e antraquinonas (reação de Bornträger).

2.5. Determinação do teor total de flavonoides

O teor total de flavonoides foi quantificado por espectrofotometria, utilizando cloreto de alumínio como reagente de complexação. A técnica baseia-se na capacidade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com flavonoides, minimizando a interferência de outras substâncias fenólicas (Salatino; Woisky, 1998; Marcucci *et al.*, 2001).

Para a determinação dos flavonoides nos extratos, 4,0 mL de cada extrato foram transferidos para tubos de ensaio de 20 mL, contendo previamente 5,0 mL de etanol absoluto.

Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de cloreto de alumínio metanólico a 5% em cada tubo. As amostras permaneceram em repouso por 30 minutos e, posteriormente, foram submetidas à leitura em espectrofotômetro a 425 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados expressos como média \pm desvio-padrão relativo, em miligramas de equivalente de quercetina por 100 g de amostra.

Para a realização do ensaio, foi construída uma curva de calibração para a quantificação dos flavonoides, utilizando soluções de concentrações seriadas (variando de 4,3 a 13,8 $\mu\text{g/mL}$) preparadas a partir de uma solução padrão etanólica de quercetina (200 mg/L).

2.6. Determinação do teor total de compostos fenólicos

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, com algumas modificações (Oliveira, 2009). Inicialmente, 0,4 mL de cada extrato obtido nas diferentes condições do planejamento experimental foi misturado a 2,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído na proporção 1:3 v/v). Após 3 minutos, adicionaram-se 2,0 mL de solução de carbonato de sódio, procedendo-se à homogeneização.

A solução permaneceu em repouso e, após duas horas de incubação, na ausência de luz e à temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV/Vis, no comprimento de onda de 765 nm. A curva de calibração para a determinação do teor total de fenólicos, expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico por 100 g de massa seca, foi construída a partir de soluções de concentrações seriadas de ácido gálico (variando de 76 a 455 $\mu\text{g/mL}$).

2.7. Análise estatística

Os dados obtidos nas análises de fenólicos totais e flavonoides foram avaliados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism®, versão 9. Inicialmente, os dados foram submetidos à verificação de normalidade (teste de Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) e de homogeneidade de variâncias (teste de Brown-Forsythe, $p > 0,05$). Em seguida, foi realizada análise de variância de uma via (One-way ANOVA), seguida do teste pós-hoc de comparações múltiplas de Tukey, com o objetivo de determinar, dentro de cada grupo, a condição mais favorável para a obtenção dos resultados mais promissores.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação fitoquímica

Todas as análises fitoquímicas qualitativas realizadas apresentaram resultados semelhantes, os quais estão representados na Tabela 2, evidenciando um padrão de qualidade entre todas as amostras avaliadas. O conhecimento das partes da planta que concentram metabólitos secundários é essencial para o aprimoramento da qualidade dos produtos, assegurando a eficácia terapêutica quando utilizados pelos consumidores (Cechinel-Zanchett, 2016).

Tabela 2: Avaliação fitoquímica dos extratos hidroetanólicos de folhas de *Morinda citrifolia* L.

Reação	Conteúdo fitoquímico	Tamanho da folha		
		Amostras		
		Até 10 cm I, 2, 3, 4 e 9	10 a 20 cm II, 12, 13, 14 e 15	20 a 30 cm 5, 6, 7, 8 e 10
Gelatina 2.5%	Taninos	-	-	-
Cloreto Férrico	Taninos	(Amarelo)	(Amarelo)	(Amarelo)
Teste de espuma	Saponinas	+	+	+
Teste Bornträger	Antraquinonas	-	-	-
pH	Antocianinas	-	-	-
NaOH	Flavonoides	(Amarelo escuro)	(Amarelo escuro)	(Amarelo escuro a claro)
Shinoda	Flavonoides	-	-	-
AlCl ₃	Flavonoides	-	-	-
Taubouk	Flavonoides	(Verde/Vermelho)	(Verde/Vermelho)	(Verde/Vermelho)
Dragendorff	Alcaloides	+	+/-	-
Liebermann-Burchard	Esteroides e triterpenos	(Verde/Vermelho)	(Verde/Vermelho)	(Verde/Vermelho)

Legenda: (+) presença; (+/-) Presença e ausência; and (-) Ausência.

No ensaio qualitativo com gelatina a 2,5%, nenhuma das amostras apresentou formação de precipitado, indicando ausência de taninos ou a presença desses compostos em concentrações inferiores ao limite de detecção, conforme descrito por Harborne (1998). Esse resultado pode ser atribuído à baixa concentração de matéria orgânica nos extratos analisados, característica inerente à metodologia proposta por Schafranski *et al.* (2019), originalmente otimizada para a avaliação da atividade antioxidante. Ainda assim, esse protocolo foi adaptado no presente estudo para a investigação do perfil de flavonoides e compostos fenólicos, em consonância com os objetivos desta pesquisa.

No ensaio com cloreto férrico, observou-se coloração amarelada em todas as amostras; entretanto, essa tonalidade não é indicativa da presença de taninos, uma vez que colorações azuladas ou esverdeadas seriam esperadas, dependendo do tipo de tanino presente (Mouco, Bernardino e Cornélio, 2003). A coloração amarelada pode refletir a ausência de grupos fenólicos reativos a esse reagente ou o predomínio de constituintes não fenólicos incapazes de formar complexos com íons férricos (Harborne, 1998). No teste com hidróxido de sódio, foi observada

a formação de coloração amarela ou amarelo-escura, correspondendo, respectivamente, à presença de flavonas, flavanonas, chalconas e isoflavonas, e de flavonóis. Esses resultados sugerem que os extratos continham diferentes classes de flavonoides, a depender da amostra analisada (Mouco, Bernardino e Cornélio, 2003).

O ensaio qualitativo de espuma, realizado de acordo com Harborne (1998), demonstrou formação de espuma persistente por mais de 30 minutos em todas as amostras, sendo que algumas apresentaram colunas de espuma volumosas e altamente estáveis, indicativas de elevado teor de saponinas. De modo semelhante, a reação de Bornträger resultou em coloração avermelhada característica em todas as amostras, confirmando a presença de antraquinonas (Simões *et al.*, 2017). Na detecção de antocianinas por meio da análise diferencial de pH, todas as amostras apresentaram pH 12, condição na qual as antocianinas tendem a se degradar ou a ser mascaradas por compostos interferentes (Mazza, 2018), o que pode explicar os resultados atípicos observados.

No teste de Shinoda, todas as amostras apresentaram resultado positivo para flavonoides, evidenciado pela mudança de coloração para tons rosados ou vermelho-alaranjados, correspondentes à presença de flavanonas e flavonas, respectivamente (Mouco, Bernardino e Cornélio, 2003). Em contrapartida, não foi observada fluorescência no ensaio com cloreto de alumínio, sugerindo baixa concentração de flavonoides. Adicionalmente, é possível que determinados compostos tenham interferido na formação do complexo $AlCl_3$ -flavonoide, impedindo a manifestação de fluorescência (Petry, Ortega e Silva, 2001).

No ensaio de Tauböck, as amostras que desenvolveram coloração vermelha indicaram a presença de flavonóis ou diidroflavonóis, possivelmente incluindo auronas ou diidrochalconas, enquanto a coloração verde sugeriu a formação de complexos entre flavonoides e íons metálicos (Simões *et al.*, 2017). A reação de Dragendorff apresentou resultados positivos em todas as amostras, evidenciados pela formação de precipitado alaranjado-avermelhado, confirmando a presença de alcaloides, conforme descrito por Costa (1994). Em relação aos esteroides e triterpenos, a reação de Liebermann-Burchard revelou colorações acastanhadas e esverdeadas entre as amostras, indicando a presença de núcleos esteroidais e triterpenoídicos, respectivamente (Xiong, Wilson e Pang, 2007).

Por fim, ressalta-se que o período de coleta constitui um fator crítico que influencia a concentração e a natureza dos metabólitos ativos. O teor de metabólitos secundários — tais como óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, saponinas, alcaloides, taninos e glicosídeos cianogênicos — pode apresentar variações sazonais

significativas (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

3.2. Determinação do teor total de flavonoides

De acordo com o planejamento fatorial, foram necessários 16 g de amostras para cada classe de tamanho foliar. Para esse fim, foram coletadas 77 folhas, sendo 40 folhas com comprimento de até 10 cm, 27 folhas entre 10 e 20 cm e 10 folhas com 30 cm de comprimento. Após o preparo e a extração das amostras, procedeu-se à quantificação do teor total de flavonoides.

Para a quantificação do teor total de flavonoides, foi construída uma curva de calibração utilizando soluções de concentrações seriadas de quercetina (4,36 a 13,08 mg/L), em triplicata, cuja equação e coeficiente de determinação (r^2) foram, respectivamente, $y = 0,0521x - 0,105$ e 0,9989. As amostras de cada extrato (em triplicata) foram analisadas em espectrofotômetro, e as absorbâncias obtidas foram aplicadas à equação da curva de calibração. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Conteúdo total de flavonoides expresso como mg de EQ/100g de extrato.

Tamanho	Nº	Média ± DP	Tamanho	Nº	Média ± DP	Tamanho	Nº	Média ± DP
	1	43,4 ± 6,7*		6	65,2 ± 0,3**		11	42,2 ± 0,4
	2	50,5 ± 2,1		7	58,5 ± 0,4		12	74,4 ± 0,2
Até 10 cm	3	74,7 ± 2,1	10 a 20 cm	8	65,7 ± 0,9**	20 a 30 cm	13	50,1 ± 0,2
	4	42,7 ± 0,3*		9	42,5 ± 1,1		14	56,1 ± 1,1
	5	21,5 ± 2,9		10	23,3 ± 2,9		15	52,7 ± 1,2

Legenda: * estatisticamente diferente, ** sem diferença estatística.

Todos os dados apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) e homogeneidade de variâncias (teste de Brown-Forsythe, $p > 0,05$), validando a aplicação da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste pós-hoc de Tukey.

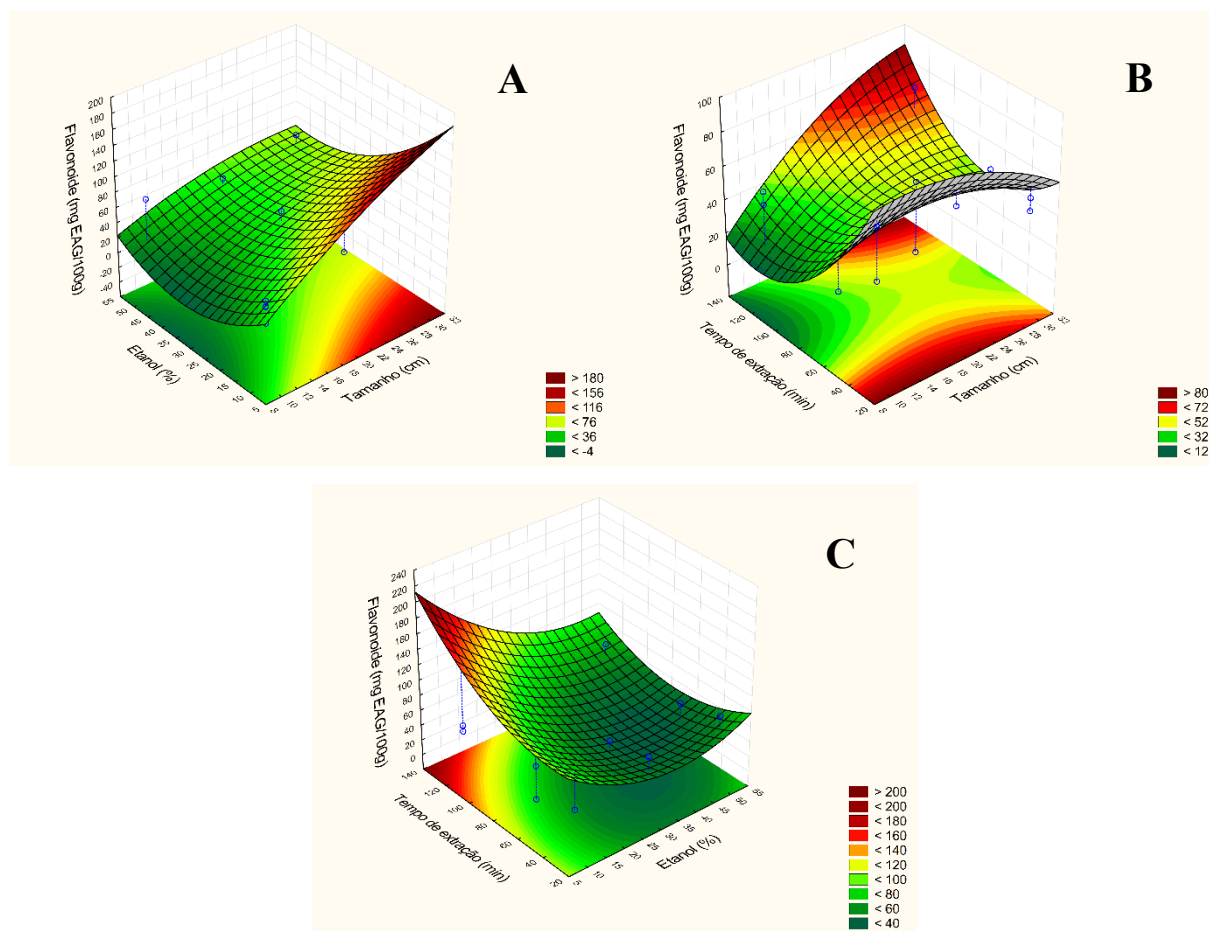
No grupo composto por folhas com comprimento de até 10 cm (amostras 1-5), o teor total de flavonoides variou de 21,5 a 74,7 mg de equivalente de quercetina (QE)/100 g de extrato, correspondendo às amostras 5 e 3, respectivamente. A ANOVA, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey ($\alpha = 0,05$), revelou diferenças estatisticamente significativas entre quase todas as amostras ($p < 0,05$), com exceção das amostras 1 e 4, que não diferiram entre si ($p = 0,9810$).

Para o grupo de folhas com comprimento entre 10 e 20 cm (amostras 6-10), os resultados variaram de 23,3 a 65,71 mg QE/100 g de extrato, referentes às amostras 10 e 8, respectivamente.

O teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) indicou diferenças estatisticamente significativas entre a maioria das amostras. As amostras 6 e 8 apresentaram os maiores valores médios, não havendo diferença significativa entre elas ($p = 0,6807$); entretanto, ambas apresentaram valores significativamente superior aos das demais amostras ($p < 0,0001$).

No grupo de folhas com comprimento entre 20 e 30 cm (amostras 11-15), o teor de flavonoides variou de 42,2 a 74,4 mg QE/100 g de extrato, correspondendo às amostras 11 e 12, respectivamente. O teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) demonstrou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre todas as amostras analisadas.

Figure 2: Gráfico de superfície resposta para tamanho, proporção do solvente extrator e tamanho da folha versus conteúdo total de flavonoide.



Conforme observado na Figura 2(A), verifica-se uma relação entre a proporção do solvente e o tamanho das folhas, indicando que extratos obtidos a partir de folhas de maior tamanho, associados a uma menor proporção de solvente orgânico, apresentaram maiores teores de flavonoides. Wang (2022) descreve que a concentração do solvente pode influenciar a

extração de flavonoides, de modo que uma maior concentração do solvente nem sempre resulta em maiores rendimentos desses compostos, podendo inclusive ocasionar redução no teor extraído. A Figura 2(B) evidencia a influência da proporção do solvente extrator e do tempo de extração, destacando que uma menor proporção de solvente, aliada a um maior tempo de extração, favorece a obtenção de flavonoides. Contudo, considera-se que tempos de extração excessivamente prolongados podem reduzir o rendimento da extração (Naczki, 2004; Silva *et al.*, 2007; Tiwari *et al.*, 2011).

A Figura 2(C) apresenta a interação entre o tamanho das folhas e o tempo de extração, indicando que quanto maior o tamanho foliar e mais prolongado o tempo de extração, maior é o teor de flavonoides obtido. Esse perfil sugere que folhas mais velhas apresentam, potencialmente, maior teor de flavonoides em comparação às folhas mais jovens. Partículas de menor tamanho oferecem maior área de contato com o solvente, facilitando a liberação de flavonoides; entretanto, quando excessivamente finas, podem comprometer a eficiência da extração, em razão da dificuldade de separação do extrato ou da retenção do solvente no interior das partículas muito pequenas (Oliveira *et al.*, 2016).

3.3. Determinação do teor total de compostos fenólicos

11

Para a determinação do teor total de compostos fenólicos, foi construída uma curva de calibração utilizando soluções de concentrações seriadas de ácido gálico (25 a 253 mg/L), cuja equação e coeficiente de determinação (r^2) foram, respectivamente, $y = 0,0018x + 0,0708$ e 0,9979. As amostras de cada extrato (em triplicata) foram analisadas em espectrofotômetro, e as absorbâncias obtidas foram aplicadas à equação da curva de calibração. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Conteúdo total de fenólicos expresso como mg de EAG/100g de extrato.

Tamanho	Nº	Média ± DP	Tamanho	Nº	Média ± DP	Tamanho	Nº	Média ± DP
	1	67,5 ± 0,9		6	57,6 ± 3,2		11	72,3 ± 0,3*
	2	51,4 ± 1,6		7	34,9 ± 1,1		12	38,3 ± 1,9
Até 10 cm	3	58,3 ± 0,5	10 a 20 cm	8	53,4 ± 0,9	20 a 30 cm	13	76,6 ± 0,6
	4	74,0 ± 0,7		9	70,4 ± 0,5		14	64,3 ± 0,3
	5	76,7 ± 1,1		10	73,6 ± 1,6		15	71,2 ± 0,5*

Legenda: * estatisticamente diferente, ** sem diferença estatística.

De modo semelhante ao observado para os flavonoides, os dados referentes ao teor de compostos fenólicos apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro–Wilk, $p > 0,05$) e homogeneidade de variâncias (teste de Brown–Forsythe, $p > 0,05$), validando a aplicação da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste pós-hoc de Tukey.

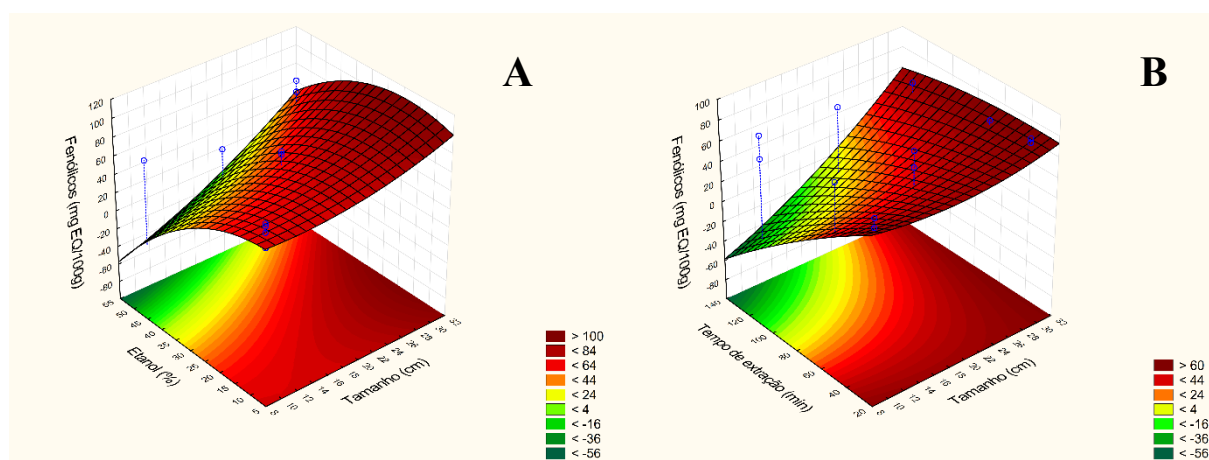
No grupo constituído por folhas com comprimento de até 10 cm (amostras 1–5), o teor total de compostos fenólicos variou de 51,4 a 76,7 mg de equivalente de ácido gálico (GAE)/100 g de extrato, correspondendo às amostras 2 e 5, respectivamente. A ANOVA, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey ($\alpha = 0,05$), revelou diferenças estatisticamente significativas entre todas as amostras analisadas ($p < 0,05$).

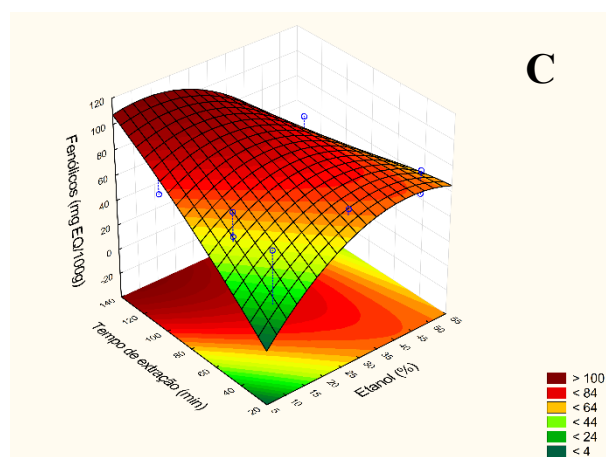
Para o grupo de folhas com comprimento entre 10 e 20 cm (amostras 6–10), o teor total de compostos fenólicos variou de 34,9 a 73,6 mg GAE/100 g de extrato, referentes às amostras 7 e 10, respectivamente. O teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) indicou diferenças estatisticamente significativas entre todas as amostras avaliadas ($p < 0,05$).

No grupo de folhas com comprimento entre 20 e 30 cm (amostras 11–15), os resultados variaram de 38,3 a 76,6 mg GAE/100 g de extrato. O teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre quase todas as amostras. As amostras 11 e 15 apresentaram valores médios semelhantes (72,3 e 71,2 mg GAE/100 g de extrato, respectivamente), não havendo diferença estatisticamente significativa entre elas ($p = 0,0688$), embora nenhuma tenha apresentado valor superior ao da amostra 13 ($p < 0,0001$).

12

Figure 4: Gráfico de superfície resposta para tamanho, proporção do solvente extrator e tamanho da folha versus conteúdo total de fenólicos.





A Figura 4(A) demonstra que, em baixas concentrações de etanol, quanto menor o tamanho das folhas, maior é o teor de compostos fenólicos. Dessa forma, observa-se que a quantidade de fenólicos é diretamente proporcional ao tamanho foliar e à concentração de etanol. Amostras provenientes de diferentes grupos podem apresentar variações em função de distintos tratamentos ou tipos de plantas, além de fatores ambientais e genéticos que podem influenciar diretamente o teor de compostos fenólicos (Dai; Mumper, 2010). A Figura 4(B) evidencia que, quanto maior a proporção de etanol e mais prolongado o tempo de extração, menor é o teor de compostos fenólicos obtido. Em outras palavras, à medida que o tempo de extração aumenta, a proporção de etanol deve ser reduzida. Na Figura 4(C), observa-se que, na maior proporção de etanol associada ao maior tempo de extração, foi obtido um baixo teor de compostos fenólicos, conforme descrito por Dai e Mumper (2010).

13

CONCLUSÃO

O presente estudo contribuiu de forma significativa para a compreensão dos parâmetros que otimizam a obtenção de produtos bioativos, aspecto essencial para aplicações nas áreas farmacêutica e de fitoterápicos. A partir das análises realizadas, evidenciou-se que o tamanho das folhas, a proporção do solvente extrator e o tempo de extração exercem influência direta e determinante sobre a concentração de flavonoides e compostos fenólicos, refletindo em potencial incremento da capacidade antioxidante.

As condições ideais para a obtenção de extratos com maior teor de flavonoides corresponderam ao uso de folhas com 10 cm de comprimento, proporção de solvente extrator de solução etanólica a 50% e tempo de extração de 30 minutos, alcançando valores de até 74,7 mg por 100 g de extrato. Em relação aos compostos fenólicos, as melhores condições foram

observadas para folhas de 10 cm, proporção de solvente extrator de solução etanólica a 10% e tempo de extração de 60 minutos, resultando em até 76,7 mg de equivalente de ácido gálico por 100 g de extrato.

Na avaliação fitoquímica, todos os extratos apresentaram perfis semelhantes quanto à presença de metabólitos secundários, como flavonoides, saponinas, alcaloides, esteroides e triterpenos, indicando que, independentemente das condições experimentais adotadas, a composição qualitativa foi mantida. Esses achados sugerem que, para a obtenção de extratos com finalidade terapêutica, é fundamental ajustar as condições experimentais de acordo com o objetivo principal, de modo a garantir a máxima eficácia e segurança em sua utilização.

REFERÊNCIAS

CECHINEL-ZANCHETT, C. C. Legislação e controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos nos países do Mercosul. *Infarma*, Brasília, v. 28, n. 3, p. 123-139, 2016.

COSTA, A. F. *Farmacognosia*. v. 2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, Basel, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010. DOI: 10.3390/molecules15107313.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000200026.

GOMES-SOUSA, N. C. *et al.* Atividades farmacológicas e sua relação com o estresse oxidativo de *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae): uma revisão integrativa. *Research, Society and Development*, Itabira, v. 10, n. 4, e30210414149, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i4.14149.

HARBORNE, J. B. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 3. ed. London: Chapman and Hall, 1998.

MARCUCCI, M. C. *et al.* Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, Amsterdam, v. 74, n. 2, p. 105-112, 2001. DOI: 10.1016/S0378-8741(00)00348-6.

MAZZA, G. *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. Boca Raton: CRC Press, 2018. DOI: 10.1201/9781351072363.

MONTGOMERY, D. C. *Design and analysis of experiments*. 10. ed. New York: John Wiley & Sons, 2019.

MOUCO, G.; BERNARDINO, M. J.; CORNÉLIO, M. Controle de qualidade de ervas medicinais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v. 31, n. 2, p. 68-73, 2003.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 2016.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.08.059.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powder of tropical fruit residues. *Food Chemistry*, Oxford, v. 115, n. 2, p. 469-475, 2009. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.12.045.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? *Engenharia Sanitária e Ambiental*, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 106-110, 2005. DOI: 10.1590/S1413-41522005000200005.

PETRY, R. D.; ORTEGA, G. G.; SILVA, W. B. Flavonoid content assay: influence of reagent concentration and reaction time. *Die Pharmazie*, Berlin, v. 56, n. 6, p. 465-470, 2001.

PHOSRITHONG, N.; NUCHTAVORN, N. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Clerodendrum* leaf extracts. *European Journal of Integrative Medicine*, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 281-285, 2016. DOI: 10.1016/j.eujim.2016.03.004.

REMILA, S. *et al.* Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus*. *European Journal of Integrative Medicine*, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 274-286, 2015. DOI: 10.1016/j.eujim.2015.03.002.

SALATINO, A.; WOISKY, R. G. Analysis of propolis: parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, London, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998. DOI: 10.1080/00218839.1998.11100961.

SCHAFRANSKI, K. *et al.* Avaliação de compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos de folhas de amoreira preta. *Química Nova*, São Paulo, 2019. DOI: 10.21577/0100-4042.20170468.

SETIC-UFSC. *Horto Didático de Plantas Medicinais do HU/CCS*. Florianópolis: UFSC. Disponível em: <https://hortodidatico.ufsc.br/noni/>. Acesso em: 10 dez. 2025.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SILVA, E. M. *et al.* Antioxidant activities and polyphenolic contents of selected Amazonian plants. *Food Chemistry*, Oxford, v. 101, n. 3, p. 1012-1018, 2007. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.02.055.

SOUSA, B. C. *et al.* *Morinda citrifolia* fruit juice reduces inflammatory cytokines expression. *Mediators of Inflammation*, London, 2017, Art. ID 6567432. DOI: 10.1155/2017/6567432.

TIWARI, P. *et al.* Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, v. 1, n. 1, p. 98-106, 2011.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 1–15, 2020. DOI: 10.32712/2446-4775.2020.819.

WANG, M. Y. *et al.* Hepatic protection by noni fruit juice. *Plant Foods for Human Nutrition*, Dordrecht, v. 63, n. 3, p. 141–145, 2008. DOI: 10.1007/s11130-008-0078-3.

WANG, Z. *et al.* Extraction and purification of antioxidative flavonoids. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Lausanne, v. 10, 2022. DOI: 10.3389/fbioe.2022.1080670.

XIONG, Q.; WILSON, W. K.; PANG, J. The Liebermann–Burchard reaction. *Lipids*, New York, v. 42, p. 87–96, 2007. DOI: 10.1007/s11745-006-3013-5.