



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

TATIANE DA SILVA DAMASCENO

**ESTUDO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO ALELOPÁTICA DOS
EXTRATOS OBTIDOS DAS CASCAS DO CAULE DE *Croton palanostigma*
KLOTZSCH.**

BELÉM

2012

TATIANE DA SILVA DAMASCENO

**ESTUDO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO ALELOPÁTICA DOS
EXTRATOS OBTIDOS DAS CASCAS DO CAULE DE *Croton palanostigma*
KLOTZSCH**

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

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Desenvolvimento de Processos

**ORIENTADORES: Prof. Dr. Davi do Socorro Barros Brasil
Prof. Dr. Lênio José Guerreiro de Faria**

**BELÉM
2012**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Damasceno, Tatiane da Silva, 1985-
Estudo do processo de extração e avaliação
alelopática dos extratos obtidos das cascas do
caule de croton palanostigma klotzsch. /
Tatiane da Silva Damasceno. - 2012.

Orientador: Davi do Socorro Barros Brasil;
Coorientador: Lênio José Guerreiro Faria.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
do Pará, Instituto de Tecnologia, Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química, Belém,
2012.

1. Croton (Botânica). 2. Euforbiácea. 3.
Extração (Química). 4. Alelopatia. I. Título.

CDD 23. ed. 583.69

TATIANE DA SILVA DAMASCENO

**ESTUDO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO ALELOPÁTICA DOS
EXTRATOS OBTIDOS DAS CASCAS DO CAULE DE *Croton palanostigma*
KLOTZSCH**

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

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos

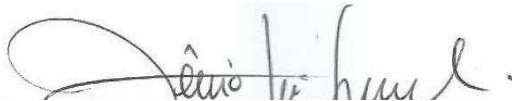
DATA DA AVALIAÇÃO: 25 / 09 / 12

CONCEITO: APROVADA

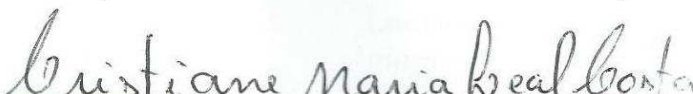
BANCA EXAMINADORA




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



Prof. Dr. Lênio José Guerreiro de Faria
(FEQ – ITEC – UFPA – Coorientador)



Profa. Dra. Cristiane Maria Leal Costa
(FEQ – ITEC – UFPA – Membro)



Profa. Dra. Giselle Maria Skelding Pinheiro Guilhon
(FAQUI – ICEN – UFPA – Membro)

Dedico este trabalho ao meu avô, **Laurival Menezes da Silva** (*em memória*), o qual sempre será recordado como um ícone para minha família, pelo exemplo de boa pessoa e de caráter; por sua dedicação e carinho, e por sempre alegrar-nos com suas estórias e seu ótimo senso de humor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **DEUS**, por está sempre comigo nos momentos mais difíceis da minha vida. A esse Deus vivo que sempre olhou para sua filha nas adversidades e principalmente nas conquistas dando provas de seu amor.

A minha mãe **Conceição M^a Pinheiro da Silva**, por seu amor e pela educação e transmissão de valores essenciais para uma boa formação como ser humano.

Ao meu amado, **Carlos Magno Wonghan**, por seu amor e carinho e amizade. Por sua dedicação, paciência e principalmente pelo grande incentivo transmitido para dar continuidade aos projetos da minha vida, além de deixá-la muito mais alegre e feliz.

A minha tia **Rosa M^a Pinheiro da Silva**, por sempre ter me incentivado nos estudos, por sempre ter acreditado em meu potencial. Pelo seu exemplo de professora e de grande educadora.

Ao Prof. Dr. **Davi do Socorro B. Brasil**, o qual eu tive o privilégio de tê-lo como orientador. Por todo conhecimento transmitido, pela capacidade de orientação o que tornou possível a realização deste trabalho; compreensão, confiança e principalmente paciência.

Ao Prof. Dr. **Lênio José Guerreiro Faria** por todo conhecimento transmitido, pela capacidade de orientação que tornou possível a realização deste trabalho; confiança, dedicação e paciência.

Ao Prof. **Antônio Pedro S. Souza Filho**, da Embrapa Amazônia Oriental, pela importante orientação nos ensaios de atividade alelopática.

A minha grande amiga **Hellen Carvalho**, por sua verdadeira amizade, pelo grande incentivo em todos os momentos da minha vida. Pela grande parceria nos estudos desde o período da graduação.

Aos colegas de curso da Pós-graduação, **Anna Sylmara Lopes, Juliane Silva, Nielson Medeiros, Paulo Rodrigo Souza e Selma Melo**, pelo conhecimento

transmitido e grande ajuda durante o decorrer do curso. Pelos momentos de descontração e alegria.

Ao amigo **Dilson Cardoso**, por todo o conhecimento transmitido, o que possibilitou o meu ingresso no PPEQ.

A Prof^a. Dra. **Cristiane Costa** pelo conhecimento transmitido e colaboração para a execução deste trabalho.

Ao coordenador do Lanagro- PA, **Francisco Airton Nogueira**, pelo voto de confiança transmitido, o que possibilitou a conciliação dos meus estudos com o trabalho.

Ao amigo **Helton Monteiro** por sua amizade, grande incentivo e confiança. Pelo conhecimento e colaboração neste trabalho.

Ao amigo **Luidi Cardoso**, por sua amizade e sua importante colaboração neste trabalho. E por sempre me alegrar nos momentos difíceis.

Muito Obrigada!

Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o Senhor e no céu passavam cenas de minha vida.

Para cada cena que passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia: um era meu e o outro do Senhor.

Quando a última cena da minha vida passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia, e notei que muitas vezes, no caminho da minha vida, havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiantes da minha vida.

Isso me aborreceu deveras e perguntei então ao meu Senhor:

- Senhor, tu não me disseste que, tendo eu resolvido te seguir, tu andarias sempre comigo, em todo o caminho?

Contudo, notei que durante as maiores tribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia.

Não compreendo por que nas horas em que eu mais necessitava de ti, tu me deixaste sozinho.

O Senhor me respondeu: - Meu querido filho.

Jamais te deixaria nas horas de prova e de sofrimento.

Quando viste na areia, apenas um par de pegadas, eram as minhas.

Foi exatamente aí, que te carreguei nos braços.

PEGADAS NA AREIA (autor desconhecido)

RESUMO

Croton palanostigma, espécie pertencente à família *Euphorbiaceae*, é uma árvore de porte médio nativa da região amazônica do Brasil. A partir de estudos químicos realizados com essa espécie foram isoladas substâncias com propriedades biologicamente úteis para a sociedade, como os diterpenos aparisthmano e a cordatina que apresentaram expressiva atividade antiulcerogênica similar à cimetidina, um medicamento que combate úlceras gástricas provocadas por estresse. Neste trabalho foi realizado o estudo do processo de extração das cascas do caule de *Croton palanostigma*, e avaliação de potencial alelopático dos extratos obtidos. No processo de extração foi utilizando o solvente acetato de etila em um extrator construído em aço inoxidável e com camisa para circulação de água aquecida, sob agitação constante, em escala laboratorial. Na análise do processo tomou-se por base o modelo estatístico Box-Behken, com três variáveis de entrada e três níveis, empregando-se temperatura, tempo de extração e relação de massa fixa de material botânico seco por volume de solvente como os fatores de entrada, e como respostas, o rendimento (Rd) de extrato obtido; a inibição de germinação de sementes de *Mimosa pudica* (IG₁); e a inibição de germinação de sementes de *Senna obtusifolia* (IG₂). Os dados foram analisados com o auxílio do software *Statística 7.0* (StatSoft USA). Quantificou-se a influência das variáveis operacionais de entrada e suas interações nas respostas, e a partir desses resultados observou-se dentro do domínio experimental que apenas a variável X₃ (relação de massa de material botânico por volume de solvente) teve um efeito positivo para o rendimento do processo. O estudo de atividade alelopática realizado com os extratos (1% m/v) apresentou elevado potencial de inibição à germinação de sementes da espécie invasora *Mimosa pudica*, acima de 50%, enquanto que, frente à espécie invasora *Senna obtusifolia*, apenas quatro dos quinze extratos submetidos ao ensaio apresentaram atividade alelopática expressiva.

Palavras-chave: *Croton palanostigma*; processo de extração; alelopatia; rendimento de extração; planejamento Box-Behnken.

ABSTRACT

Croton palanostigma, species belonging to the family Euphorbiaceae, is a medium-sized tree native to the Amazon region of Brazil. Chemical studies performed with this species were isolation of substances with useful biological activity, such as the diterpenes aparisthmano and cordatina that showed significant antiulcer activity such as cimetidine, a drug that treats stomach ulcers caused by stress. This work was conducted to study the extracting process of stem bark of *Croton palanostigma*, and evaluation of allelopathic potential of the extracts. The extraction process was using the solvent ethyl acetate in a stainless steel extractor jacketed for the circulation of heated under constant agitation, in a laboratory scale. The process analysis was based on the model-Box Behken with three input variables and three levels, using temperature, extraction time and ratio of mass of dry plant material per volume of solvent as the input factors and answers the income (Rd) extract obtained; germination inhibition of the seeds of *Mimosa pudica* (IG₁) and germination inhibition of the seed of *Senna obtusifolia* (IG₂). The data were analyzed using the software *Statistica 7.0* (StatSoft USA). The influence of the operating variables of input and their interactions in the responses were quantified, and from these results, it was observed within the experimental domain that only the variable X₃ (mass ratio of plant material per volume of solvent) had a positive effect on the process yield. The study of the allelopathic activity performed with extracts (1% m/v) showed a high potential inhibiting more than 50% of seeds the germination of the invasive species *Mimosa pudica*, while using *Senna obtusifolia* as test plant, only four of the fifteen extracts tested in the test showed significant allelopathic activity.

Keywords: *Croton palanostigma*; extraction process; allelopathy; extraction yield; Box-Behnken design;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Desenho 1: Representação de <i>Croton palanostigma</i>	24
Fotografia 1: <i>Croton palanostigma</i>	24
Fotografia 2: amostras de folhas, ramos e flores de <i>Croton palanostigma</i>	25
Mapa 1: Distribuição geográfica de <i>Croton palanostigma</i> no Brasil (a) e na América Latina(b).....	25
Estrutura 1: Estrutura molecular de aparisthmano.....	27
Estrutura 2: Estrutura molecular da cordatina.....	27
Estrutura 3: Estrutura molecular da cimetidina.....	27
Esquema 1: Modelo geral de um sistema de transformação.....	35
Fotografia 3: Cascas do caule de <i>Croton palanostigma</i>	44
Fotografia 4 (a) e (b): Equipamento utilizado no processo.....	48
Desenho 2: Esquema do extrator.....	48
Fluxograma 1: Representação da obtenção dos extratos AcOEt de <i>Croton palanostigma</i>	50
Fotografia 5 (a) e (b): Extratos AcOEt obtidos das cascas do caule de <i>Croton palanostigma</i>	50
Fotografia 6: <i>Mimosa pudica</i> (a) e a <i>Senna Obtusifolia</i> (b).....	51
Fotografia 7 (a) e (b): Placas de Petri com sementes pré-germinadas.....	52
Gráfico 1: Diagrama de Pareto dos efeitos individuais e combinados em relação à resposta Rendimento - Rd (%)......	55
Gráfico 2: Resíduos versus valores preditos para RD.....	59
Gráfico 3: Teste de normalidade para resíduos.....	59
Gráfico 4: Superfície de resposta para a resposta Rd (%) , X_1 versus X_2 , com $X_3=1$	61
Gráfico 5: Curva de nível para a resposta Rd (%) , X_1 versus X_2 , com $X_3=1$	61
Gráfico 6: Efeitos dos extratos (1% m/v) de AcOEt das cascas do caule de <i>Croton palanostigma</i> sobre a germinação de sementes de <i>Mimosa pudica</i>	63
Gráfico 7: Diagrama de Pareto dos efeitos em relação à resposta $IG_1(\%)$	64
Gráfico 8: Efeitos dos extratos (1% m/v) em acetato de etila das cascas do caule de <i>Croton palanostigma</i> sobre a germinação de sementes de <i>Senna obtusifolia</i>	66
Gráfico 9: Diagrama de Pareto para a resposta $IG_2(\%)$	67
Gráfico 10: Resíduos versus valores preditos para IG_2	69
Gráfico 11: teste de normalidade dos resíduos para IG_2	70
Gráfico 12: Superfície de resposta para IG_2 , X_1 versus X_2 ($X_3=1$).....	71
Gráfico 13: Curva de nível para IG_2 , X_1 versus X_2 ($X_3=1$).....	72
Gráfico 14: Representações gráficas da função desejabilidade para as respostas Rd, IG_1 e IG_2	73

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Planejamento de Experimentos de três Níveis.....	37
Tabela 2: Escala de valores de desejabilidade individual ou global.....	41
Tabela 3: Variáveis de entrada e seus respectivos níveis.....	45
Tabela 4: Matriz de planejamento (Box-Behnken).....	47
Tabela 5: Matriz de experimentos e respostas.....	53
Tabela 6: Efeitos estimados e interação na resposta Rd (%).....	54
Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) para Rd (%).....	57
Tabela 8: Faixa de resíduos.....	60
Tabela 9: efeitos estimados para a resposta IG₁(%)	63
Tabela 10: análise de variância (ANOVA) para IG ₁	65
Tabela 11: efeitos estimados para a resposta IG₂(%)	66
Tabela 12: Análise de variância (ANOVA) para a resposta IG ₂ (%).....	68
Tabela 13: faixa de resíduos.....	70
Tabela 14: valores atribuídos na otimização via função desejabilidade.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AcOEt	Acetato de etila
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b_k	Coeficientes de regressão
C_0	Número de pontos centrais
d_i	Metade da diferença dos valores dos níveis altos e baixos z_i
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
F	Estatística de Fischer
f_k	Função de variáveis
G	Germinação
GL	Grau de liberdade
H_0	Hipótese nula
IG	Inibição de germinação
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
K	Número de variáveis
KI	Klotzsch
L	Linear
LEPRON	Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais
MSR	Metodologia de superfície resposta
m/v	Massa/volume
N	Número de experimentos
OMS	Organização mundial de saúde
ρ	Nível de significância
PBB	Planejamento Box-Behnken
PE	Ponto de ebulição
PPEQ	Programa de Pós Graduação em Engenharia Química
pH	Potencial hidrogeniônico
Q	Quadrática
®	Marca registrada
Rd	Rendimento
R: M: S	Relação de massa de amostra por volume de solvente
SQ	Soma quadrática
UFPA	Universidade Federal do Pará
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

X_i	Variável independente codificada
Y_k	Variável dependente de resposta
z_i	Valor real da variável de entrada
Z_i^0	Valor central de média aritmética
ε	Componente do erro aleatório
Σ	Somatório

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1. CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	21
3.2. DESCRIÇÃO DA FAMÍLIA <i>Euphorbiaceae</i>	21
3.3 DESCRIÇÕES DO GÊNERO <i>Croton</i>	22
3.4 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE DE <i>Croton palanostigma</i> Klotzsch.....	23
3.5 ESTUDOS REALIZADOS DA ÉSPECIE DE <i>Croton palanostigma</i>	26
3.5.1 Constituintes isolados de <i>Croton palanostigma</i>	28
3.5.1.1 Diterpenos.....	28
3.5.1.2 Triterpenos.....	29
3.5.1.3 Esteroides.....	29
3.6 EXTRAÇÕES DE PRODUTOS NATURAIS.....	30
3.6.1 Maceração	31
3.6.2. Percolação	31
3.6.3. Extração por Soxhlet	31
3.6.4. Extração com CO₂ supercrítico	32
3.6.5. Extração por ultrassom	32
3.6.6. Extração por assistida micro-ondas	32
3.6.7. Extração por arraste a vapor	33
3.7 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	33
3.7.1 Conceitos gerais de planejamento e experimentação	34
3.7.2 Planejamento Box-Behnken (PBB)	36
3.7.3 Metodologia de superfície de resposta	37
3.7.4 Função desejabilidade global	38
3.8 ALELOPATIA.....	41
3.8.1 Atividade alelopática no gênero <i>Croton</i>	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 MATÉRIA-PRIMA.....	44
4.2 MÉTODOS.....	44
4.2.1 Cálculo do rendimento do extrato acetato de etila (%)	44
4.2.2 Planejamento experimental da extração	45

4.2.3 Processo de extração.....	47
4.2.3.1 Procedimentos de execução da extração.....	49
4.2.4 Metodologia utilizada no ensaio de atividade alelopática.....	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	53
5.2 PARA A RESPOSTA RENDIMENTO DOS EXTRATOS – Rd (%).....	54
5.2.1 Influência das variáveis operacionais de entrada na resposta rendimento dos extratos – Rd (%).....	54
5.2.1.1 Efeitos principais e interações.....	54
5.2.1.2 Gráfico de Pareto.....	55
5.2.1.3 Análise de Variância (ANOVA).....	56
5.2.1.4 Modelo proposto.....	57
5.2.1.5 Análise de resíduos.....	68
5.2.1.6 Análise da superfície de resposta e contornos.....	60
5.3 RESULTADOS DOS BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA COM OS EXTRATOS DE <i>Croton palanostigma</i>	62
5.3.1 Resultados para avaliação de inibição de germinação de sementes para <i>Mimosa pudica</i> - IG₁(%).....	62
5.3.1.1 Efeitos estimados para IG ₁ (%).....	63
5.3.1.2. Gráfico de Pareto.....	64
5.3.1.3. Análise de variância (ANOVA).....	64
5.3.2 Resultados para avaliação de inibição de germinação de sementes para <i>Senna obtusifolia</i> – IG₂(%).....	65
5.3.2.1 Efeitos estimados.....	66
5.3.2.2. Gráfico de Pareto.....	67
5.3.2.3 Análise de Variância (ANOVA).....	67
5.3.2.4. Modelo proposto.....	68
5.3.2.5 Análise de resíduos.....	69
5.3.2.6 Análise da superfície de resposta e contornos.....	71
5.4 OTIMIZAÇÃO VIA FUNÇÃO DESEJABILIDADE.....	72
CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	77
APÊNDICE.....	84

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre as propriedades terapêuticas das plantas medicinais obtidas a partir da medicina popular vem sendo acumulado durante séculos e esse conhecimento empírico simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de várias comunidades e grupos étnicos. O uso e a eficácia de plantas medicinais são atribuídos às observações populares que contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem apesar de não terem seus constituintes químicos muitas vezes conhecidos, mas tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas ao longo dos anos (MACIEL et al., 2002).

Além da importância na medicina tradicional, as plantas podem fornecer para a indústria farmacêutica, direta ou indiretamente, os princípios ativos que serão comercializados como medicamentos. Por outro lado, o potencial farmacológico das plantas medicinais como fonte de medicamentos e fármacos é ainda, nos dias de hoje, pouco explorado. Mesmo com o avanço de novos processos de síntese orgânica e biotecnologia (RATES 2001; VILLAS BÔAS, GADELHA, 2007).

A utilização de plantas como medicamento está fundamentada em estudos etnofarmacológicos que, partindo do uso tradicional e do conhecimento popular sobre as propriedades farmacológicas (anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, antiespasmódica, antitérmica, laxativas, entre outras) de certas drogas vegetais, indicam o potencial para o desenvolvimento de novos fitoterápicos (SCOPEL, 2005).

Segundo Novais e Costa, 2003, apesar do longo tempo que se conhece o potencial curativo das plantas, apenas recentemente estas tornaram-se objeto de estudo científico em que concerne as suas variadas propriedades medicinais. O conhecimento a respeito dessas propriedades é requisito essencial para a transformação da planta medicinal em um produto fitoterápico. Sendo assim, pesquisa com plantas medicinais tem sido e continua a ser considerada uma alternativa importante na busca de novas drogas com propriedades terapêuticas.

A Organização Mundial de Saúde - OMS define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos

semissintéticos”. A diferença entre planta medicinal e fitoterápica reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico.

De acordo com a Secretaria de Vigilância Sanitária, ANVISA, em sua portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto final acabado, embalado e rotulado”. Já no caso do fitofármaco, tem como definição “é a substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais ou mesmo, mistura de substâncias ativas de origem vegetal”.

Para o desenvolvimento tecnológico de um produto fitoterápico são necessários estudos prévios em diversas áreas do conhecimento como estudos botânicos, agrônômicos, químicos, de atividade biológica e desenvolvimento de metodologias analíticas (NAVARRO, 2005).

A literatura revela que família *Euphorbiaceae* contém uma grande diversidade de produtos naturais que possuem diversas atividades farmacológicas, em especial o gênero *Croton*, com uma vasta quantidade de constituintes químicos como terpenoides, flavonoides e alcaloides (PALMEIRA JÚNIOR et al., 2005; SOUZA BRITO et. al., 1998).

Segundo Salatino et al., 2007, devido ao histórico no senso popular de que espécies de *Croton* apresentam propriedades terapêuticas, pesquisas foram aprofundadas para o estudo do potencial farmacológico do gênero, e em especial algumas espécies populares como a “sacaca” (*C. cajucara*) sobre os seus aspectos de composição química e suas atividades biológicas; “sangue do dragão” (*C. lechleri* e *C. draconoides* são conhecidas assim pelo senso popular, devido apresentarem uma seiva viscosa e avermelhada quando extraída da casca do caule), “urucuana” (*Croton urucurana*), “marmeleiro-preto” (*C. sonderianus*), e demais espécies muito utilizadas na medicina tradicional.

Estudos realizados com produtos naturais obtidos do gênero *Croton* têm demonstrado propriedades antiulcerogênicas (LEWIS e HANSON, 1991) como, por

exemplo, os diterpenos do tipo clerodano isolados de *Croton sublyratus* (KITAZAWA et al., 1980). Experimentos realizados pelo grupo de pesquisa de produtos naturais da UNICAMP (SP) mostraram que um norditerpeno com esqueleto clerodânico isolado das cascas do caule de *Croton cajucara* Benth, denominado de *trans*-desidrocrotonina (SIMÕES et al., 1979), revelou expressiva atividade antiulcerogênica (SOUZA et al., 1998).

A espécie *Croton palanostigma* Klotzsch denominada no senso popular como “marmeleiro”, ou balsa-rana é conhecida por suas propriedades fitoterápicas, como no tratamento de várias doenças, entre elas reumatismo, cicatrização de feridas, hemorragias, gastrites e úlceras (AYALA et al., 2001). De acordo com Sandoval et al., 2005, o látex oriundo das cascas do caule de *Croton palanostigma* é utilizado na medicina tradicional por apresentar caráter anti-inflamatório. Este látex é usado na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças, entre elas reumatismo, cicatrização de feridas, hemorragias, gastrites e úlceras (ARELLANO, ESTRELLA, MILLER apud AYALA et al., 2001).

Segundo Brasil (1999), a investigação química dos extratos hexânicos, extratos diclorometânicos e metanólico das cascas do caule de *Croton palanostigma*, levando ao isolamento de diterpenos, triterpenos, esteroides e compostos aromáticos, os quais estão concentrados em sua maioria nessa parte da espécie.

Estudos revelaram que os diterpenos do tipo clerodano aparisthmano e cordatina isolados de *C. palanostigma* apresentaram expressiva atividade farmacológica em relação ao combate de úlceras gástricas (HIRUMA LIMA et al., 2000a; HIRUMA LIMA et al., 2001).

Face ao exposto, essa dissertação visa dar continuidade às pesquisas em relação à espécie de *Croton palanostigma*, estudando-se o processo de extração das cascas do caule dessa planta, visto que grande parte de componentes identificados em estudos anteriores estão mais concentrados nessa parte da planta. Para o processo de extração o solvente escolhido foi o acetato de etila, o qual apesar de não ter sido testado em pesquisas anteriores apresenta polaridade próxima ao diclorometano, sendo não clorado e, portanto, apresenta menos prejudicial ao meio ambiente.

As técnicas de planejamento e análises de experimentos são algumas das ferramentas utilizadas para melhorar as características de qualidade dos produtos ou processos de fabricação, reduzir o número de testes e otimizar o uso de recursos. Outra ferramenta muito utilizada no processo e no desenvolvimento de produtos é a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), que consiste no uso de técnicas matemáticas e estatísticas de otimização para melhorar e desenvolver processos na obtenção de um produto final de qualidade (BORROR; MONTGOMERY, 2000; MONTGOMERY, 2001).

Desta forma, visando melhorar e determinar as condições ótimas para o processo de extração, dentro do domínio experimental estudado, foram utilizados experimentos estatisticamente planejados para se determinar um melhor rendimento do processo. O modelo de planejamento estatístico utilizado para o estudo desse processo foi o Box-Behnken. Esse planejamento permite a construção de um modelo polinomial de segunda ordem para caracterizar ou otimizar um processo com um menor número de experimentos.

Os extratos obtidos das cascas do caule de *Croton palanostigma*, foram submetidos a ensaios que foram realizados para avaliar o potencial alelopático dos mesmos, a fim de estudo preliminar para se caracterizar um possível bio-herbicida.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o processo de extração das cascas do caule de *Croton palanostima* Klotzsch utilizando acetato de etila como solvente, a partir de experimentos estatisticamente planejados e investigar o potencial de atividade alelopática dos extratos das cascas do caule de *Croton palanostigma* frente às plantas invasoras de pastagem *Mimosa pudica* e *Senna obtusifolia*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar testes e arranjos experimentais que favoreçam um melhor rendimento de obtenção de extratos de acetato de etila de *Croton palanostima*.
- ✓ Determinar condições ótimas de extração e avaliar influências das variáveis de entrada como temperatura, tempo de extração e relação massa de material botânico por volume de solvente utilizado na extração, nas respostas de:

Rendimento em percentagem de extrato AcOEt – Rd (%);

Inibição de germinação de sementes de *Mimosa pudica* – IG₁ (%);

Inibição de germinação de sementes de *Senna obtusifolia* – IG₂ (%);

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DE *Croton palanostigma*:

- Reino: *Plantae*
- Divisão: *Magnoliophyta*
- Classe: *Magnoliopsida*
- Ordem: *Malpighiales*
- Família: *Euphorbiaceae*
- Subfamília: *Crotonoideae*
- Gênero: *Croton*
- Espécie: *Croton palanostigma* Klotzsch.

3.2. DESCRIÇÃO DA FAMÍLIA *Euphorbiaceae*

A família *Euphorbiaceae* possui cerca de 300 gêneros e 8900 espécies identificadas (BITTNER *et al.*, 2001). É uma família essencialmente tropical que ocorre em vários habitats diferentes, desde regiões áridas a trópicos úmidos. No Brasil, estima-se a ocorrência de 1.100 espécies e 72 gêneros, habitando os mais diferentes tipos vegetacionais (SOUZA, LORENZI, 2006).

Como resultado, as plantas desta família, desenvolveram várias formas de vida, incluindo ervas, arbustos, plantas suculentas e árvores com folhas alternadas, inteiras ou partidas, em geral com estípulas, lactescentes ou não. Podem possuir flores pequenas, dotadas de estames e frutos deiscentes ou não, entre outras características (ROGÉRIO *et al.* 2007). De acordo com Webster *et al.* 1994, esta família foi classificada em cinco subfamílias: *Crotonoideae*, *Oldfieldioideae*, *Ricinocarpoidae* e *Euphorbioideae*.

As espécies de *Euphorbiaceae* merecem destaque como uma família de importância na medicina popular e econômica, especialmente na alimentação humana, produção de látex (borrachas), óleos utilizados na indústria de tintas, plásticos, sabões duros, fibras sintéticas, pigmentos para tecidos, perfumes, batons e lubrificantes de motores e turbinas especialmente os extraídos de espécies do gênero *Ricinus* L. (MACHADO, 2007). Essa família é conhecida em diversas partes do mundo por

propriedades terapêuticas e toxicidade. A alta diversidade de efeitos descritos é um reflexo da elevada diversidade química das plantas deste grupo (SALATINO et al., 2007).

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

3.3 DESCRIÇÕES DO GÊNERO *Croton*.

Croton é um gênero com cerca de 1300 espécies, amplamente distribuídas em regiões tropicais do Novo e Velho Mundo. Várias espécies há muito tempo desempenham papel importante nos usos tradicionais de plantas medicinais na África, Ásia e América do Sul. As espécies desse gênero são geralmente odoríferas e contêm um látex cáustico que causa dermatite e que pode ser venenoso. Podem ser ervas ou arbustos (SALATINO, 2007). De acordo com Berry et al., 2005, o gênero é conhecido por inflorescências geralmente racemosa com flores pistiladas e estaminadas polistêmones, indumento com tricomas simples, estrelados ou escamiformes glândulas peciolares e folhas senescentes.

Muitas espécies de *Croton* têm uso medicinal popular. Algumas são utilizadas simplesmente como bebidas, na forma de chás. Tais usos incluem tratamento de câncer, constipação intestinal, diarreia e outros problemas digestivos, diabetes, feridas externas, febre, hipercolesterolemia, hipertensão, inflamação, vermes intestinais, malária, dor, úlceras e obesidade (SALATINO et al., 2007). Segundo Craveiro et al., 1981, algumas espécies do gênero *Croton* são conhecidas como fontes de diterpenos, principalmente do tipo clerodânico furânico. Também são relatados diterpenos do tipo cleistantano (CRAVEIRO et al., 1982), caurano e labdano (GONZALEZ et al., 1981).

Ensaio farmacológico frequentemente vêm confirmando os usos tradicionais de espécies de *Croton*. Grande parte dos ensaios farmacológicos trata do clerodano *trans*-desidrocrotonina isolado de *Croton cajucara* envolvendo uma grande diversidade de efeitos, incluindo hipolipidêmico, hipoglicêmico, antiestrogênico e anticancerígeno.

Efeitos citotóxicos também vêm sendo observados em ensaios com alcaloides como a taspina encontrada em *C. draconoides*, *C. lechleri* e *C. palanostigma*; e diterpenoides, secocauranias, labdânias e cembranoides. Vários outros efeitos de substâncias de *Croton* têm sido relatados, incluindo anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, antimaláricos, antimicrobianos, antiespasmódicos, anti-ulcerogênicos, antivirais e miorelaxantes (SALATINO et al., 2007), anti-leishmaniose (ROSA, et, al. 2003) e anti-*Trypanossoma cruzi* (CAMPOS et al., 2010)

3.4. DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE DE *Croton palanostigma*

Croton palanostigma Klotzsch (Desenho 1, p. 24) é uma das mais amplamente utilizadas plantas medicinais da América do Sul, sendo conhecido pelos nomes vulgares “marmeleiro” e “balsarana” (SECCO, 2008). É uma árvore (Fotografia 1, p. 2) é de porte médio ou alto, com altura que varia de 3 a 12 m, apresentando folhas com ápice agudo, mais raro curto acuminado, as flores estaminadas e pistiladas com tricomas estrelado lepidotos e estames 10~ 11 mm. A planta possui casca externa marrom cinza ou cinza, com manchas verdes azuis pelos líquenes, de aparência anelada, pelas cicatrizes semicirculares; casca interna branco-creme ou creme, de 3~4 mm de espessura, textura fibrolaminar (POLLITO, 2004).

Segundo Secco et al., 2008, no Brasil a ocorrência da espécie é nos estados de Roraima, Amazonas, Acre, Pará, Mato Grosso, Rondônia e Maranhão. Na América Latina é encontrada, além do Brasil, na Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Venezuela e no Peru, de acordo com o Mapa (a) e (b), p. 25, onde espécies do seu gênero são conhecidas como “sangre de grado” ou “sangre de dragão”, por secretarem uma seiva avermelhada oriunda da casca do caule (POLLITO, 2004). Vale-se ressaltar que a espécie *Croton palanostigma* não apresenta essa coloração característica, apenas apresenta um látex incolor viscoso.

Desenho 1: Representação de *Croton palanostigma* Klotzsch.



Fotografia 1: *Croton palanostigma*.



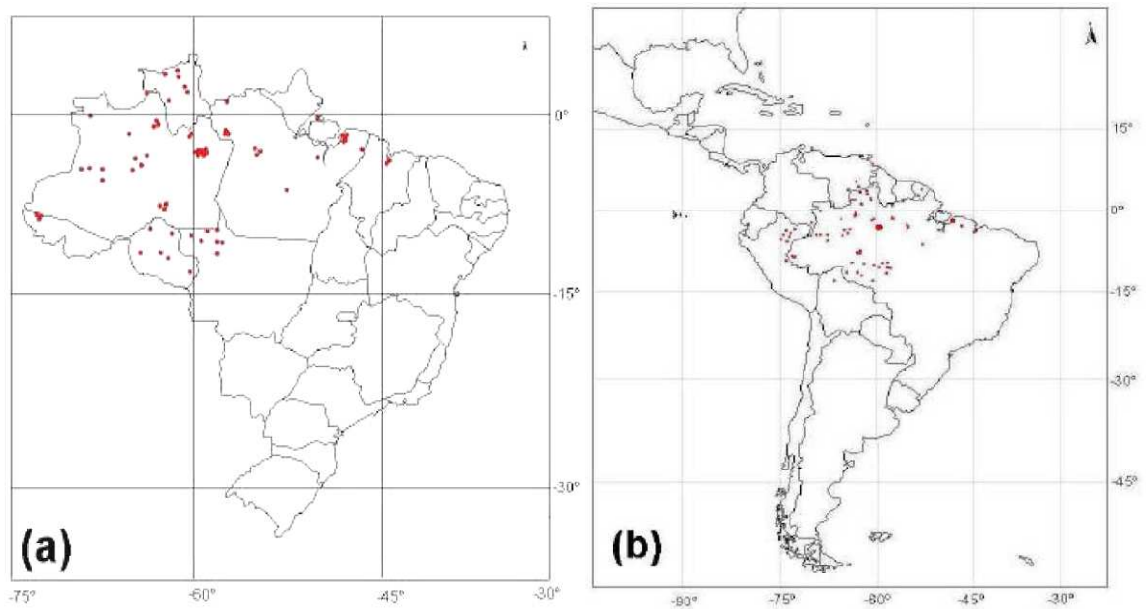
FONTE (1): SECCO, 2008.

Para Simionatto et al., 2007, *Croton palanostigma*, possui como constituintes de seu látex, óleos voláteis, proantocianidinas, alcaloides e diterpenos (principalmente do tipo clerodano). De acordo com Socorro et al., 2007, na medicina tradicional é utilizada como anticancerígeno, antidiabetes, hipocolesterolêmica, antimalária, antiulcerogênica antifúngica, anti-hemorrágica, antioxidante, antisséptica e analgésica.

Fotografia 2 (a)(b)(c)(d): Amostras de folhas, ramos e flores de *Croton palanostigma*.



Mapa 1: Distribuição geográfica de *Croton palanostigma* no Brasil (a) e na América Latina (b).



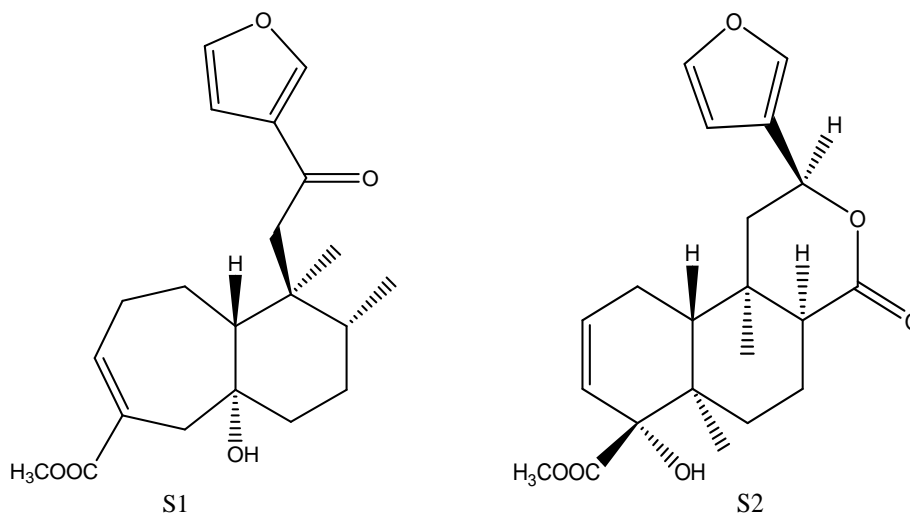
FONTE: POLLITO, 2004.

3.5 ESTUDOS REALIZADOS DA ÉSPECIE DE *Croton palanostigma*.

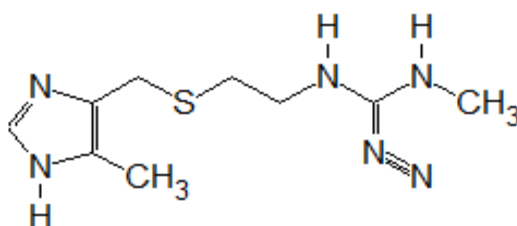
Estudos realizados com o látex de *Croton palanostigma* e de outras espécies de *Croton* demonstraram diversas ações biológicas como a de induzir a formação de muco gástrico (SANDOVAL et al., 2002a), apresentar um importante efeito protetor da mucosa gástrica e potencial efeito terapêutico (AYALA et al., 2001; AYALA et al., 2000; AYALA et al., 1999), possuir efeito antioxidante sobre a mucosa gástrica, induzir apoptose em células gastrintestinais humanas cancerosas e não produz modificações bioquímicas hepáticas e renais em ratos (SANDOVAL et al., 2006; SANDOVAL et al., 2002b; SANDOVAL et al., 2005). Estudos científicos relatam que Progrado[®], um extrato de *Croton palanostigma*, tem notavelmente potente propriedade antioxidante e impediu a destruição da cartilagem humana por enzimas denominadas por matriz metaloproteinases (MMPs) (SALATINO et al., 2007).

Inicialmente, os primeiros ensaios de *Croton palanostigma* foram realizados pelo grupo de Química de Produtos Naturais da UFPA. No estudo químico preliminar com as cascas do caule, a espécie foi identificada como *Aparisthmium cordatum* (família *Euphorbiaceae*), devido a equívoco cometido na identificação botânica preliminar. Essa correção foi feita pelo Dr. Ricardo Secco, do Museu Paraense Emílio Goeldi, que corrigiu a identificação botânica do material. Uma exsicata (MG n.182.822) encontra-se depositada no herbário do citado museu, classificado o material botânico como *Croton palanostigma* Klotzsch (BRASIL et al, 2008).

Nos primeiros ensaios foram isolados dois diterpenos, com esqueleto clerodano, aparisthmano (S1) (MÜLLER et al., 1986) e cordatina (S2) (DADOUN et al., 1987). Posteriormente, uma nova investigação mais detalhada foi feita das cascas do caule e folhas, para a caracterização dos demais constituintes e reisolamento desses diterpenos. De acordo com Brasil, 1999, nessa investigação, foi possível constatar que grandes partes dessas substâncias estavam em maior concentração nas cascas do caule, voltando-se o foco da pesquisa para os extratos para essa parte do espécime, obtendo-se extratos hexânico, diclorometânico e metanólico. Esses extratos passaram por processos de fracionamento possibilitando o isolamento de seus constituintes.



Os diterpenos furânicos aparisthmano e cordatina isolados a partir da casca do caule de *Croton palanostigma* apresentam expressiva atividade antiulcerogênica, em nível semelhante à cimetidina (Tagamet®) (S3), um medicamento que inibe a secreção de ácido gástrico, bem como a liberação de pepsina e gastrina, sendo utilizado para combater úlceras provocadas por estresse (HIRUMA-LIMA et al., 2000, 2001).



S3

Estudos toxicológicos preliminares indicaram que aparisthmano e cordatina apresentam elevada hepatotoxicidade, diminuindo as chances de esses diterpenos tornarem-se fitofármacos aplicados à inibição de úlceras pépticas, porém, não se descarta a possibilidade deles apresentarem outras ações farmacológicas benéficas que renovem as perspectivas de se tornarem medicamentos (BRASIL, 2008).

Ensaio biológicos com os dos diterpenos aparisthmano e cordatina foram realizados para se avaliar a atividade antimicrobiana das respectivas substâncias. Testes foram feitos para os fungos *Aspergillus flavus* (IOC 3974); *Aspergillus niger* (IOC 200); *Fusarium oxysporum* (IOC 4375) e leveduras *Candida guilliermondii* (IOC 2889); *Candida parapsilosis* (IOC 2882). Quando comparadas ao alto nível de inibição

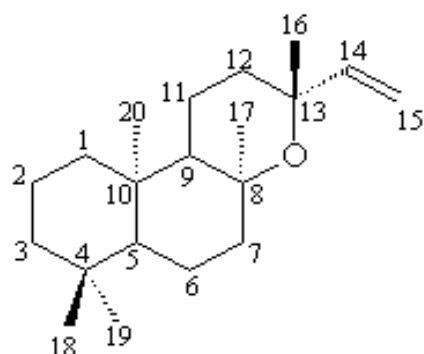
do antibiótico nitrato de miconazol, os resultados obtidos foram negativos, indicando que essas substâncias não apresentam atividade suficiente para serem utilizadas como antimicrobianos frente às cepas testadas (DAMASCENO, MONTEIRO, 2009).

3.5.1 Constituintes isolados de *Croton palanostigma*.

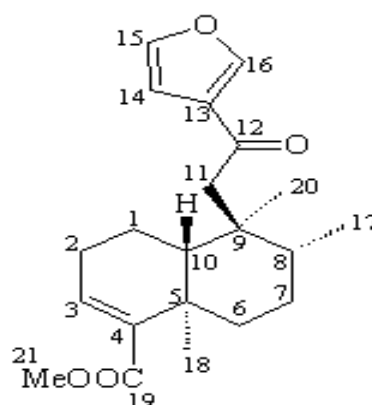
Segundo Brasil et al 2009, além do aparisthmano e a cordatina, foram isolados a partir de *Croton palanostigma* as seguintes substâncias:

3.5.1.1 Diterpenos:

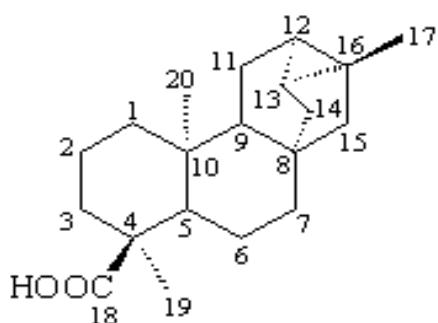
S4: Óxido de *ent*-13-epimanoila



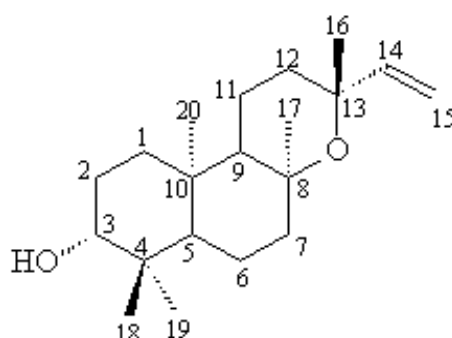
S5: Éster metílico do ácido 12-oxohardwickico

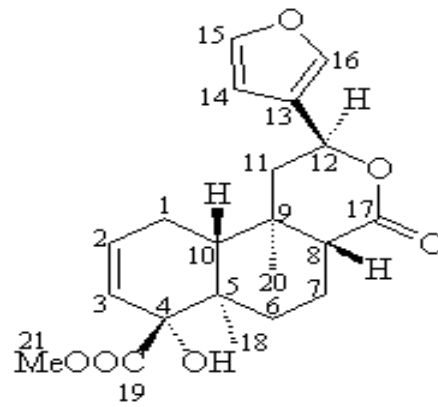


S6: Ácido *ent*-trachiloban-18-óico

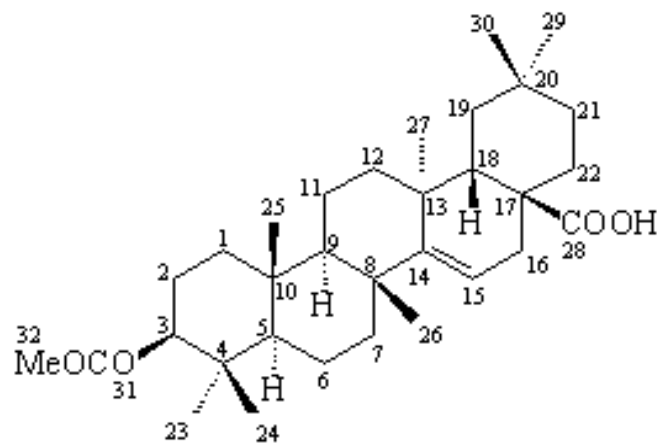


S7: Ribenol

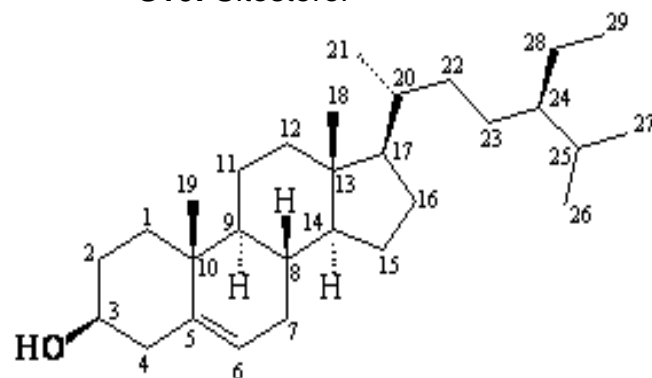


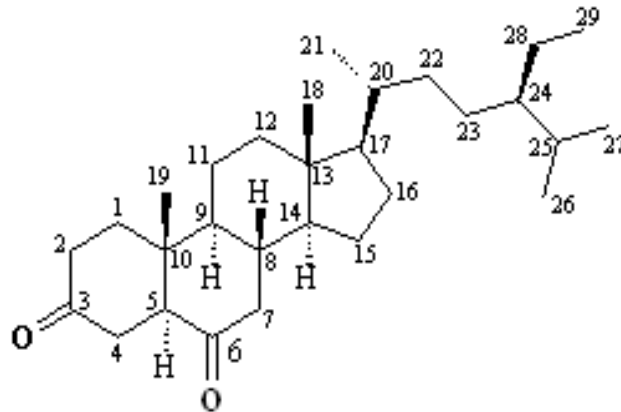
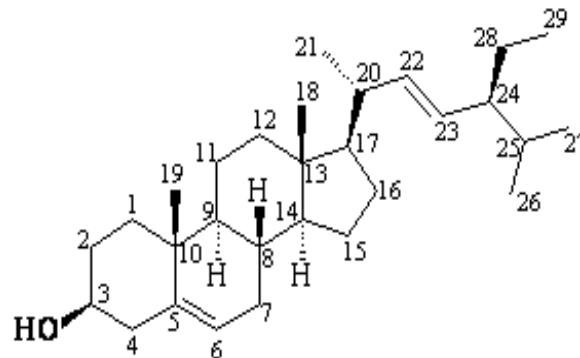
S8: 8-epicordatina

3.5.1.2 Triterpenos

S9: Ácido 3-O-acetilauritico

3.5.1.3 Esteroides

S10: Sitosterol

S11: Estigmastan-3,6-diona**S12: Estigmasterol**

3.6 EXTRAÇÕES DE PRODUTOS NATURAIS

A extração objetiva retirar do material botânico as substâncias desejadas, em que consiste em uma técnica de separação baseada nos diferentes graus de solubilidade dos constituintes. Existem diversos tipos de extração, que variam de acordo com o caráter da substância a ser extraída (BLACKADDER; NEDDERMAN, 1982).

A extração com solventes orgânicos é usada em todas as partes do mundo todo para obter maior rendimento ou produtos que não podem ser obtidos por nenhum outro processo. Geralmente são utilizados solventes apolares como o diclorometano e éter, mas possuem o inconveniente de extrair compostos lipofílicos, além dos óleos voláteis (GUENTHER, 1977).

A seguir, alguns exemplos de extração de produtos naturais:

3.6.1 Maceração

Consiste em por em contato o material botânico com a quantidade de solvente pré-estabelecida, à temperatura ambiente, em recipiente fechado, durante 2 a 14 dias. É um processo não seletivo que resulta em um equilíbrio entre o material e o solvente, e é influenciado por fatores que dependem do material (natureza, tamanho da partícula, umidade e quantidade). A velocidade com que se obtém um equilíbrio é função do tamanho de partícula e inchamento das células, bem como da viscosidade e da polaridade do solvente (Farmacopéia Brasileira, 1996). Dentre as desvantagens do processo estão a lentidão, a impossibilidade de extrair totalmente os princípios ativos do material e possibilidade de contaminações, quando se empregam solventes com grande quantidade de água.

3.6.2. Percolação

A percolação também é conhecida por lixiviação. É uma das técnicas mais eficientes para a extração de componentes ativos vegetais. Caracteriza-se pela extração exaustiva de substâncias ativas. Consiste em submeter o material pulverizado e devidamente armazenado em um recipiente cilíndrico ou cônico (percolador de vidro ou metal), à ação de um solvente que atravessa toda extensão do recipiente, se deslocando de cima para baixo. O produto obtido é denominado de percolado. Diferentemente da maceração, a percolação é uma operação dinâmica, indicada na extração de substâncias ativas presentes em pequenas quantidades, quando estas são poucos solúveis ou ainda quando o preço da droga vegetal é relativamente alto.

3.6.3. Extração em extrator tipo Soxhlet

É um método de extração contínua de sólidos com solventes de baixo ponto de ebulição, que utiliza o extrator de Soxhlet em escala laboratorial. Tem a desvantagem de consumir grandes volumes de solventes e levar um tempo de extração longo, em torno de 72 horas. Assim, os componentes extraídos podem ser afetados pela decomposição térmica ou pela reação com solventes (SOARES et al., 1988 apud RODRIGUES, 2002).

3.6.4. Extração com CO₂ supercrítico

A extração com CO₂ supercrítico é uma técnica que usa o poder solvente do dióxido de carbono (CO₂) em temperaturas e pressões próximas e acima do seu ponto crítico. A extração com fluido supercrítico baseia-se no controle da solubilidade via manipulação da temperatura e pressão. A densidade máxima do fluido é obtida em pressão elevada e temperatura próxima daquela crítica do fluido. A solubilidade de determinada substância no fluido supercrítico é controlada por dois fatores: a volatilidade da substância (que é função da temperatura) e o poder de solvatação do fluido supercrítico (que é função da densidade). A amostra a ser extraída é exposta ao CO₂ supercrítico, o fluido movimenta-se continuamente pela amostra, dissolvendo e removendo os componentes. A separação dos componentes extraídos é obtida pela redução da densidade por meio da diminuição da pressão, em temperatura constante ou pelo aumento da temperatura em pressão constante ou, ainda, pela combinação destas. A expansão da solução na região coletora separa o gás CO₂ expandido dos componentes extraídos. Portanto, essa técnica combina as características de extração e destilação simultaneamente (ARAÚJO, 2011).

3.6.5. Extração por ultrassom

Nesta técnica a amostra moída é misturada ao solvente e colocada em um recipiente, que é imerso em um banho de ultrassom. A amostra é submetida, geralmente, a vários solventes em ordem crescente de polaridade, dependendo da classe de compostos a serem extraídos, há um tempo determinado (muito menor do que na extração com Soxhlet) e a uma frequência própria do banho. Após, o extrato é submetido à filtração e concentração. A extração por ultrassom apresenta uma série de vantagens, tais como a alta reprodutibilidade da técnica, sua utilização para uma ampla faixa de tamanho de amostra, rapidez no processamento da amostra, uso de pouca quantidade de solvente, baixo custo e pequeno número de interferentes (RODRIGUES, 2002).

3.6.6. Extração assistida por micro-ondas

Nesta técnica, o material vegetal é colocado dentro de um balão de fundo redondo com água destilada (solvente), em seguida o balão é colocado dentro do forno

micro-ondas, programa-se a potência e o tempo de extração do aparelho, geralmente o tempo de extração ocorre em minutos. O processo de extração se inicia quando a água alcança a sua temperatura de ebulição, onde o vapor d' água rompe as estruturas celulares, começa arrastar os constituintes presentes na amostra, seguem para o condensador onde sofrem resfriamento rápido e o condensado é depositado no coletor. A separação do óleo essencial é realizada por centrifugação (NASCIMENTO, 2011).

3.6.7. Extração por arraste a vapor

A técnica de extração por arraste a vapor é uma das mais antigas e utilizadas nas operações de extração empregadas nos processos associados à indústria química. A extração utilizando vapor de água é uma operação unitária baseada na diferença de volatilidade de determinados compostos presentes na matéria-prima vegetal. A indústria prefere esta técnica devido a sua maior simplicidade e economia, assim como possibilita o processamento de quantidades significativas de material vegetal de uma única vez (GUENTHER, 1977). É uma técnica simples e consiste em fazer circular vapor d'água por um recipiente que contem o material a ser extraído (CASSEL; VARGAS; BRUN, 2008).

3.7 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

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

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

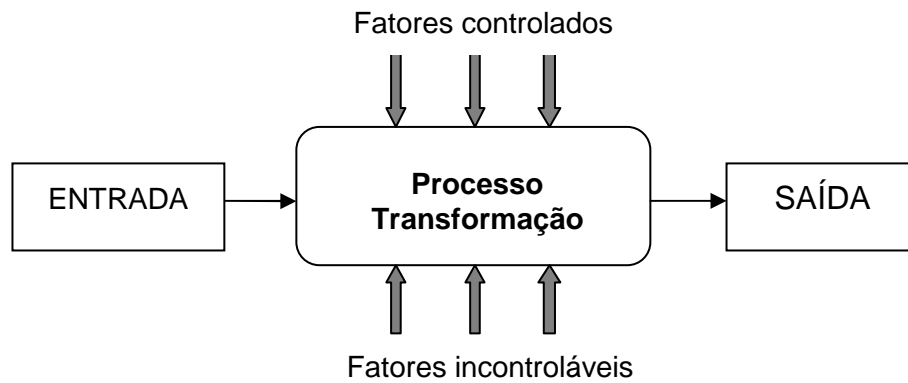
3.7.1 Conceitos gerais de planejamento e experimentação:

Alguns conceitos e termos são fundamentais para a aplicação de técnicas de planejamento e execução de experimentos (MONTGOMERY, 1991):

- Variáveis, ou fatores, do processo que são mais influentes no(s) parâmetro(s) de resposta de interesse;
- Níveis de ajuste das variáveis do processo influentes na resposta, de modo que a variabilidade do parâmetro de resposta seja mínima;
- Níveis de ajuste das variáveis influentes do processo, de modo que o valor do resultado seja próximo do valor nominal;
- Níveis de ajuste das variáveis influentes na resposta, de modo que o efeito das variáveis não controláveis seja reduzido.
- Tratamentos: é a combinação de níveis de fatores de controle, isto significa que cada uma das corridas do experimento representará um tratamento.
- Efeito principal: é a diferença média observada na resposta quando se muda o nível do fator de controle investigado.
- Efeito de interação: é a metade da diferença entre os efeitos principais de um fator nos níveis de outro fator.
- Matriz de experimentos: é plano formal construído para conduzir os experimentos. Nessa matriz estão inclusas as variáveis de controle, os níveis e os tratamentos do experimento.
- Blocos: é a técnica utilizada para controlar e avaliar a variabilidade produzida pelos fatores perturbadores dos experimentos.
- Análise de variância: utilizada para verificar se os efeitos e interação dos fatores são significativos nas respostas.

O experimento projetado ou planejado é um teste ou uma série de testes nos quais se induzem mudanças deliberadas ou estímulos nas variáveis de do processo ou do sistema, de tal forma que seja possível observar e identificar os efeitos nas respostas ou nas variáveis de saída. O processo ou sistema de transformação é representado pela combinação de máquinas, métodos, pessoas e outros recursos que transformam uma entrada em produtos acabados ou semi acabados, com características ou parâmetros específicos, de acordo com o Esquema 1:

Esquema 1: Modelo geral de um sistema de transformação.



Fonte: MONTGOMERY (1991).

A metodologia associada do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (BOX, et al. 1978).

Quando o experimento envolve o estudo dos efeitos de dois ou mais fatores, a estratégia mais eficiente é o planejamento fatorial. Nesta estratégia, os fatores são variados juntos e não um por vez, ou seja, em cada tentativa completa ou réplica do experimento, todas as combinações possíveis dos níveis são investigadas (MONTGOMERY; RUNGER, 2003). O planejamento é chamado fatorial completo quando se tem presente todas às combinações possíveis, entre os níveis de cada fator, caso contrário ele será dito planejamento fatorial incompleto.

É necessário um grande número de combinações de testes experimentais para realizar um projeto experimental. São muito utilizados, pela viabilidade econômica, projetos experimentais fracionários onde são desprezados os efeitos de mais alta ordem, que normalmente na prática, não influenciam significativamente a variável de resposta e diminuem o número de experimentos (COSTA; FARIA, et, al. 1998).

Um exemplo de planejamento fatorial é chamado de 2^K , onde K representa o número de variáveis e 2 o número de níveis, ou seja, valores e qualidade que as variáveis podem assumir. Experimentos fatoriais desse tipo são muito utilizados em laboratórios ou locais onde as fontes externas de variação são geralmente bem controladas.

Outro aspecto importante é que para experimentos com um grande número de fatores sendo considerado, o fatorial completo resulta em um número extremamente grande de combinações para serem testadas. Nesta situação o planejamento fracionário é usado para estrategicamente selecionar um subconjunto de combinações para testar com o objetivo de identificar os fatores com pouca ou nenhuma importância no desempenho do sistema (HARREL; GHOSH; BOWDEN, 2000).

3.7.2 Planejamento Box-Behnken (PBB)

O delineamento fatorial de Box-Behnken é um planejamento experimental utilizado para procedimentos de otimização e o modelo, formado pela combinação fatorial 2^k e um delineamento de bloco incompleto, em que consiste na repetição do ponto central, para se medir a variabilidade experimental, mais um conjunto de pontos fatoriais ancorados no ponto central definindo a região de interesse (BOX; BEHNKEN, 1960).

Esse planejamento permite a construção de um modelo polinomial de segunda ordem para caracterizar ou otimizar um processo com um **menor número de experimentos**. Este modelo inclui um nível intermediário (0) estabelecido para a condição de fatores.

O número de experimentos necessários para o desenvolvimento do PBB é definido através da Equação 1, onde N é o número de experimentos, K é o número de variáveis, e C_0 é o número de pontos centrais.

$$N=2K(K-1) +C_0 \quad (1)$$

Box e Behnken descreveram uma classe de projetos de experimentos fatoriais incompletos de nível 3 para a estimativa de coeficientes em um polinômio de segundo grau.

O projeto seguido pelo modelo PBB, nesta matriz de experimento, para a otimização da extração, utiliza-se 3 variáveis. Nesta tabela, exceto se indicado de outra forma, o símbolo $(\pm 1, \pm 1, \dots, \pm 1)$ quer dizer que todas as combinações de mais e de menos níveis podem ser ensaiadas. Sempre que um fatorial obtido não confundir os

principais efeitos e duas interações de fator uns com os outros, ele pode ser usado em substituição ao fatorial inteiro.

Tabela 1: Planejamento de experimentos de três Níveis

Nº do planejamento	Nº de variáveis	Matriz de planejamento	Nº de ensaios
1	3	$\begin{pmatrix} \pm 1 & \pm 1 & 0 \\ \pm 1 & 0 & \pm 1 \\ 0 & \pm 1 & \pm 1 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$	$\left. \begin{array}{r} 12 \\ +3 \\ \hline \end{array} \right\} N=15$

Fonte: Box-Behnken (1960).

3.7.3 Metodologia de superfície de resposta

A metodologia de superfície resposta (MSR) consiste em um grupo de técnicas matemático-estatísticas utilizadas para análise e modelagem de problemas, nos quais uma resposta particular é função de diversas variáveis e o principal objetivo é otimizar esta resposta. As superfícies representam uma boa forma de ilustrar graficamente a relação entre as diferentes variáveis experimentais e as respostas, oferecendo valiosas informações sob o comportamento das variáveis na região estudada (MONTGOMERY, 1991).

A MSR é comumente empregada na análise de dados experimentais, resultando na otimização do processo. As técnicas de planejamento fatorial e metodologia de superfícies de resposta tem sido empregadas para otimizar diversos processos, minimizando o número de experimentos, em sua maioria trabalhosa e dispendiosa, permitindo a otimização do processo e melhorando a qualidade dos produtos finais (ANDRADE, 2009).

Neste método são realizados planejamentos fatoriais para cujos resultados são ajustados modelos matemáticos. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos experimentais. O modelamento ocorre em busca do caminho de

máxima inclinação de um determinado modelo, sendo o caminho pelo qual a resposta varia de forma mais pronunciada (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2007).

O modelo matemático de uma função f_k , equação 2a, pode ser a obtenção de uma estimativa mais precisa da condição ideal de operação representado por um polinômio de acordo com a Equação 2b, para que seja possível a obtenção de uma estimativa mais precisa da condição ideal de operação de um processo.

$$y_k = f_k(X_1, X_2, \dots, X_k) \quad (2a)$$

$$Y_k = b_{k0} + \sum_{i=1}^k b_{ki} X_i + \sum_{i=1}^k b_{kii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k b_{kij} X_i X_j + \varepsilon_i \quad (2.b)$$

Em que Y_k é a resposta (variáveis dependentes) para X_i ($i= 1, 2, \dots, k$) que são as variáveis independentes codificadas, ε representa um componente do erro aleatório, e os parâmetros b_{k0} , b_{ki} , b_{kii} e b_{kij} representam os coeficientes de regressão constantes. As variáveis independentes estão linearmente relacionadas conforme a Equação 3:

$$X_{ki} = \frac{z_i - z_i^0}{d_i} \quad (3)$$

z_i É o valor real da variável de entrada em unidades originais;

z_i^0 É o valor central de média aritmética entre os valores do nível alto e do baixo da variável original Z_i ;

d_i Representa a metade da diferença dos valores dos níveis altos e baixos Z_i .

3.7.4 Função desejabilidade global

A técnica de otimização simultânea denominada “Função Desejabilidade” é baseada na transformação de uma função desejabilidade para cada variável de

resposta, com valores descritos num intervalo [0, 1], no qual 0 representa um valor completamente indesejado, e 1 o valor mais desejável (ótimo alcançável).

De acordo com Barros Neto, Scarminio e Bruns (2007) uma vez que as funções de desejabilidade tenham sido especificadas para todas as respostas, devemos combiná-las numa desejabilidade global, normalmente dada pela média geométrica das “m” desejabilidades individuais, artifício pelo qual a otimização simultânea das variáveis respostas se reduz à maximização de um único valor, a desejabilidade global que é definida pela equação:

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m} \quad (4)$$

Sendo que: m é número de respostas. Se qualquer resposta d_m for completamente indesejável ($d_m = 0$), então a desejabilidade global é igual a zero.

Conforme se deseje maximizar, minimizar ou assumir um valor mediano para uma variável de respostas, diferentes tipos de funções desejabilidade podem ser utilizadas. A otimização numérica pode ser obtida por meio de programas computacionais específicos disponíveis no mercado, como por exemplo, o *Statistica*® e *Design Expert*®.

O programa *Statistica 7.0*, utiliza a abordagem usada por Derringer e Suich (1980), que é baseada no seguinte princípio: seja L_i , L_s e M os valores inferior, superior e mediano, respectivamente, os quais são desejados para a resposta \hat{Y} , com $L_i \leq M \leq L_s$.

Os expoentes s e t determinam a importância da função para encontrar o valor desejado; sendo que para $s = t = 1$, a função desejabilidade aumenta linearmente com M; para $s < 1$ e $t < 1$, a função é convexa; e para $s > 1$ e $t > 1$, a função é côncava.

Se a resposta deve ser maximizada, a desejabilidade individual é definida na forma da Equação 4.1:

$$d = \begin{cases} 0 & \hat{Y} < Li \\ \left(\frac{\hat{Y} - Li}{M - Li} \right)^s & Li \leq \hat{Y} \leq M \\ 1 & \hat{Y} > M \end{cases} \quad (4.1)$$

Se a resposta deve ser minimizada, a desejabilidade individual é definida na forma da Equação 4.2:

$$d = \begin{cases} 0 & M < \hat{Y} \\ \left(\frac{Ls - \hat{Y}}{Ls - M} \right)^t & M \leq \hat{Y} \leq Ls \\ 1 & \hat{Y} > Ls \end{cases} \quad (4.2)$$

Se a resposta é do tipo mediana, então sua função desejabilidade individual é bilateral, em que o valor desejado está localizado entre o limite inferior e superior, sendo definida por meio da Equação 4.3:

$$d = \begin{cases} 0 & \hat{Y} < Li \\ \left(\frac{\hat{Y} - Li}{M - Li} \right)^s & Li \leq \hat{Y} \leq M \\ \left(\frac{Ls - \hat{Y}}{Ls - M} \right)^t & M \leq \hat{Y} \leq Ls \\ 1 & \hat{Y} > Ls \end{cases} \quad (4.3)$$

Portanto, a desejabilidade incide em três etapas:

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

- Definir as funções desejabilidade individuais para cada resposta;
- Maximizar a desejabilidade global, D, em relação aos fatores controlados.

A Tabela 2 apresenta os critérios de aceitabilidade para as respostas, propostas por Akhnazarova e Kafarov (1982), para a determinação do ponto ótimo, em função de restrições nas variáveis operacionais de entrada.

Tabela 2: Escala de valores de desejabilidade individual ou global

Faixa (D ou d)	Descrição da Resposta
0,80 a 1,00	Aceitável e excelente
0,63 a 0,80	Aceitável e bom
0,37 a 0,63	Aceitável, porém pobre.
0,20 a 0,37	Faixa de limite de aceitação
0,00 a 0,20	Inaceitável

3.8. ALELOPATIA

Desde muito se sabe que algumas espécies de plantas podem prejudicar o desenvolvimento de outras que crescem na sua proximidade. A explicação de que se tratava de mais um dos fenômenos inexplicáveis que ocorrem na natureza foi admitida durante muito tempo. Foi somente nas primeiras décadas deste século, mais propriamente na década de 1930, que o termo alelopatia foi cunhado para explicar as interações químicas que ocorrem em comunidades de plantas, tais como culturas agrícolas, ervas daninhas ou gramíneas e leguminosas em pastagens.

A alelopatia tem sido descrita como qualquer efeito direto ou indireto, danoso ou benéfico que uma planta (incluindo microorganismos) exerce sobre outra, pela produção de compostos químicos ou aleloquímicos, liberados no ambiente de diversas formas, como lixiviação de tecidos vivos e mortos da planta, decomposição de tecidos ou volatilização (RICE, 1992). As fitotoxinas também podem exercer os mais variados tipos de ação de efeitos sobre crescimento, absorção de nutrientes, respiração, etc. (SOUZA FILHO, 2002).

Ao longo dos anos, tem-se comprovado que as plantas produzem substâncias químicas com propriedades alelopáticas que afetam ou não algumas espécies de

plantas (especificidade). Tais substâncias encontram-se distribuídas em concentrações variadas nos diferentes tecidos da planta e durante o seu ciclo de vida (periodicidade). Quando essas substâncias são liberadas em quantidades suficientes causam efeitos alelopáticos que podem ser observados na germinação, no crescimento e/ou no desenvolvimento de plantas já estabelecidas e, ainda, no desenvolvimento de microorganismos (CARVALHO, 1993). Segundo Áquila, et al 2000, a alelopatia é responsável por alterações expressivas na densidade, na diversidade e no desempenho das espécies, o que resulta em alterações na sustentabilidade dos agrossistemas.

As plantas em geral produzem compostos químicos alelopáticos que atuam não só sobre outras plantas, também como interferentes na conservação, dormência das sementes, crescimento das plântulas e vigor vegetativo das adultas, como também são capazes de defendê-las e ataques de patógenos e outros herbívoros (ALMEIDA, 1988). Sob certas condições, esses compostos são liberados no ambiente, sendo responsáveis por efeitos positivos e negativos no crescimento de outras plantas (KATO-NOGUSHI; INO, 2001).

Segundo, Newman et, al.1988, afirma que na alelopatia, ervas daninha podem influenciar culturas e que muitas vezes, no entanto, o efeito alopático causado pela presença de ervas daninha em culturas são atribuídos somente à competição, ou então, simplesmente, denominados interferência. O que difere a alelopatia da competição entre plantas é o fato da competição reduzir ou remover do ambiente um fator de crescimento necessário para ambas às plantas, como água, luz, nutrientes e outros, enquanto a alelopatia ocorre pela adição de um fator químico ao meio. Nos ecossistemas agrícolas, a ocorrência da alelopatia é muito importante na determinação da interferência entre culturas e comunidade infestante.

A ciência da alelopatia tem o potencial de contribuir muito com a produção e estabilidade da agricultura. O grande desafio é utilizar os conhecimentos gerados promovendo uma agricultura sustentável, com proteção à biodiversidade (DAKSHINI, 1999).

Malícia (*Mimosa pudica*) e mata-pasto (*Senna obtusifolia*) são duas importantes plantas daninhas a invadir diferentes cultivos na região amazônica, em particular, e no

Brasil, em geral. As plantas daninhas causam perdas de ordem econômica e biológica aos cultivos tropicais.

Os estudos preliminares de atividade alelopática de uma dada fração de uma planta, cuja atividade é desconhecida, partem sempre do emprego de extratos brutos, que tanto podem ser de baixa polaridade (extrato hexânico, por exemplo), como de alta polaridade (por exemplo, metanólico ou hidroalcoólico) (SOUZA FILHO, NASCIMENTO, 2012). A atividade biológica de um dado material em análise depende tanto da concentração como do limite da resposta da espécie afetada. O limite de inibição não é constante, porém intimamente ligado à suscetibilidade da espécie receptora. Os efeitos de um dado químico ou o conjunto de compostos químicos pode ser tanto estimulatório quanto inibitório (AN et al., 1993).

Considerando-se o limite de inibição de 50% para especificar a potencialidade de um dado extrato (DUDAI et al., 1999).

3.8.1 Atividade alelopática no gênero *Croton*.

Das várias espécies com potencial alelopático descritas na literatura, algumas do gênero *Croton* foram identificadas, como por exemplo, *C. bonplandianum* (THAPAR e SINGH, 2006). No entanto, ainda é pouco conhecido o potencial no gênero. O marmeleiro-preto (*Croton sonderianus*) é o principal arbusto colonizador das caatingas sucessionais do Nordeste que tem grande poder invasor (CARVALHO et al., 2001). Pesquisas envolvendo extratos aquosos e/ou resíduos foliares de marmeleiro-preto incorporados ao solo evidenciaram a interferência desta espécie na germinação e desenvolvimento de espécies daninhas, muitas vezes, atribuído à diminuição dos pigmentos fotossintetizantes (ALBUQUERQUE et al., 2009).

Estudos realizados para avaliar o potencial alelopático de *Croton pullei* mostraram que extratos do caule de *C. pullei* evidenciaram efeitos inibitórios na germinação de sementes e no crescimento da radícula (> 50%) de *Mimosa pudica* (PEIXOTO, et al 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

O material botânico utilizado neste trabalho foram cascas do caule de *Croton palanostigma*, coletado em maio de 2012, no município de Castanhal-PA.

Fotografia 3: Cascas do caule de *Croton palanostigma*.



As cascas do caule foram secadas em estufa de circulação à 40°C para remoção da umidade por 72 horas. Uma vez secas, foram reduzidas em pedaços menores e trituradas em moinho de facas tipo Wiley. Para a obtenção de uma amostra moída mais homogênea e para aumentar superfície de contato, a mesma foi submetida à pulverização em peneiras de malha de abertura de 2,00 mm (ABNT: 10); e 4,86 mm (ABNT: 4). Obtendo-se uma massa total equivalente a 5 Kg. Deste material foram pesadas quinze amostras de 100,00 g, cada uma, as quais foram destinadas ao planejamento experimental. O teor de umidade final do material botânico submetido aos ensaios (corridas) foi de 7,2%.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cálculo do rendimento do extrato acetato de etila (%).

Para o cálculo do rendimento da extração do extrato a base de acetato de etila, a partir das cascas do caule de *C. palanostigma*, em base seca, foi utilizada a seguinte equação:

$$Rd = \frac{M_o}{M} 100$$

Sendo que:

Rd representa o rendimento da extração, em percentual (%);

M_o é a massa de extrato obtida experimentalmente, em gramas;

M é a massa da matéria-prima em base seca, em gramas.

4.2.2 Planejamento experimental da extração

Para avaliar a otimização do processo de extração das cascas do caule de *C.palanostigma* por acetato de etila, foi utilizada como matriz de planejamento o modelo de Box-Behnken (1960), de acordo com a Tabela 3, constituído em três níveis (+1, 0 e -1) com três réplicas no ponto central, totalizando 15 corridas, sendo 12 corridas originais e 3 réplicas no ponto central.

As variáveis operacionais de entrada (variáveis independentes originais) são: temperatura em grau Celsius; tempo de extração, em minutos; e relação de massa fixa de material botânico, em gramas, por volume de solvente, em mL, sendo codificadas respectivamente como X_1 , X_2 e X_3 . As variáveis de entrada e seus respectivos níveis estão detalhados a seguir, de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3: Variáveis de entrada e seus respectivos níveis.

VARIÁVEL (Unidade)		NÍVEIS		
		-1	0	1
Temperatura (°C)	X_1	20	40	60
Tempo (min.)	X_2	30	60	90
Relação M/S (g/mL)	X_3	1:2	1:4	1:6

MS: Massa de material botânico (100 g) por volume de solvente (200, 400, 600 mL).

A escolha das variáveis de entrada e seus respectivos níveis devido aos seguintes fatores:

- O processo de extração é realizado através do uso de um reator em sistema fechado, o qual se pode trabalhar com variação de temperatura;

- Extrações por solvente de material botânico deve-se realizar o teste de variação de temperatura: a frio ou a quente para verificar a maior eficácia; pode influenciar de maneira positiva, aumentando a solubilidade de determinado princípio ativo, assim como de maneira negativa, promovendo a degradação de princípios ativos termolábeis.
- Deve-se levar em consideração o ponto de ebulição do solvente utilizado no processo, por tanto, a faixa de temperatura de trabalho deve estar abaixo do PE. No caso do solvente utilizado acetato de etila o PE é 77,1°C.
- O tempo de execução do experimento também deve ser levado em consideração, testes relacionando esse período, podem poupar gastos desnecessários; varia em função do material a ser extraído, do estado de divisão do extrato, natureza das substâncias, do solvente empregado, agitação e temperatura.
- O volume total interno do reator é de 880 mL, o que restringe grandes quantidades de carga de material;

Em todos os ensaios foram mantidos fixos os seguintes fatores: agitação constante e massa de material botânico, 100 gramas.

Foram avaliados os efeitos das seguintes variáveis de entrada para as variáveis de resposta: o rendimento percentual do extrato obtido – Rd (%); Inibição de germinação de sementes de *Mimosa pudica* – IG₁(%); Inibição de germinação de sementes de *Senna obtusifolia* – IG₂(%).

As corridas experimentais foram efetuadas de forma aleatória, conforme as matrizes de planejamento na Tabela 4:

Tabela 4: Matriz de planejamento (Box-Behnken)

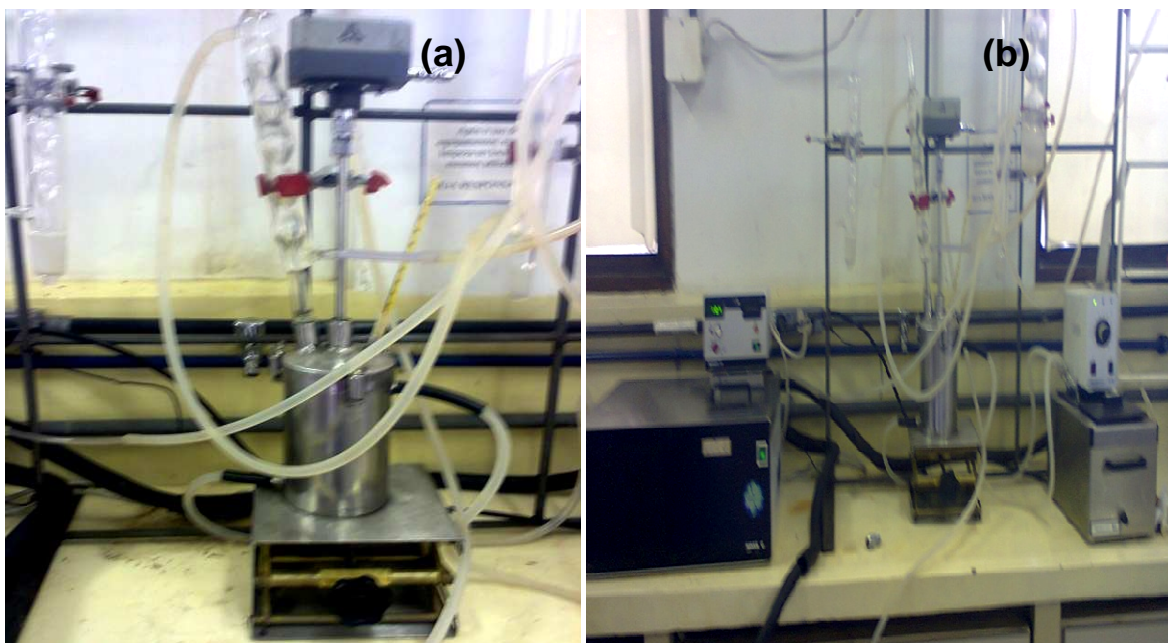
CORRIDA	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

4.2.3 Processo de extração

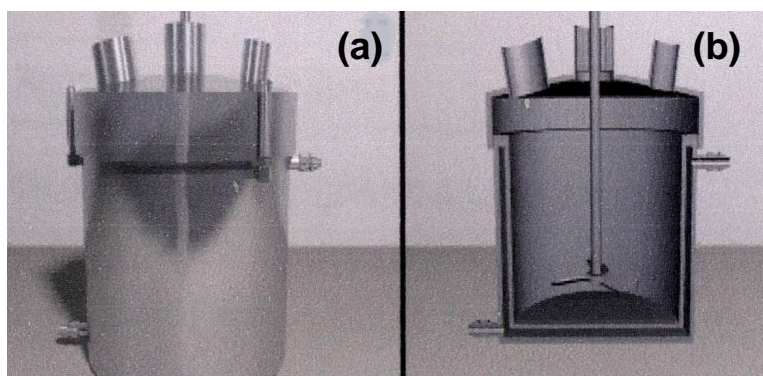
Para realizar o processo de extração foi utilizado, em escala laboratorial, um extrator encamisado, construído em aço inoxidável, com agitador acionado por ar comprimido, da marca Roerwerk, acoplado a um banho termostático de circulação de fluido da marca HAAKE, modelo F3, e também interligado a um sistema de resfriamento, o qual se utiliza de um condensador ligado a um banho, de circulação de fluido, criostático.

No extrator foi acoplado um termômetro para mensurar a temperatura interna no extrator. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais – LEPRON - localizado no Laboratório de Engenharia Química da Universidade Federal do Pará.

Fotografia 4 (a) e (b): Equipamento utilizado no processo.



Desenho 2: Esquema do extrator



A extração é uma técnica que visa à separação, isolamento e purificação de compostos orgânicos. Esse procedimento baseia-se na maior solubilidade de diversos compostos de uma mistura em determinado solvente.

A escolha do solvente é feita, a partir da facilidade de dissolução da substância (polaridade) e pela facilidade com que se pode isolar o soluto extraído, Isto é, do baixo ponto de ebulição do solvente para sua posterior evaporação.

As amostras foram pesadas em balança analítica, da marca CELTAC, modelo: Fa2104N.

4.2.3.1 Procedimentos de execução da extração

Após interligar o extrator nas fontes de resfriamento e aquecimento, foram seguidos os seguintes procedimentos:

- O banho de aquecimento, acoplado ao extrator, foi acionado para que ocorra fluxo de circulação interna de fluido de aquecimento – água destilada;
- A massa de material botânico é inserida no extrator;
- Determinado volume de solvente é adicionado ao reator, de acordo com a matriz de planejamento;
- A temperatura é ajustada de acordo com a matriz de planejamento;
- O sistema é fechado. O agitador é acionado por mecanismo de ar comprimido (marca Labor-Ruhrwerk).
- O tempo de extração também é determinado de acordo com a matriz de planejamento.
- Após o término da corrida, o extrato é retirado, do reator, em mistura com a torta;
- O extrato é separado da torta por filtração a vácuo, e em seguida, concentrado em evaporador rotativo, da marca QUIMIS, separando o solvente para recuperação;
- O extrato concentrado é transferido para um recipiente previamente seco e pesado. Após a evaporação completa do restante de solvente em capela de exaustão (marca QUIMIS), é verificada a massa final do extrato obtido.

Vale-se ressaltar que em cada corrida executada, o tempo de extração é iniciado, a partir do momento em que a temperatura estimada é atingida, por conseguinte controlada, em sistema fechado.

Fluxograma 1: Representação da obtenção dos extratos AcOEt de *Croton palanostigma*.

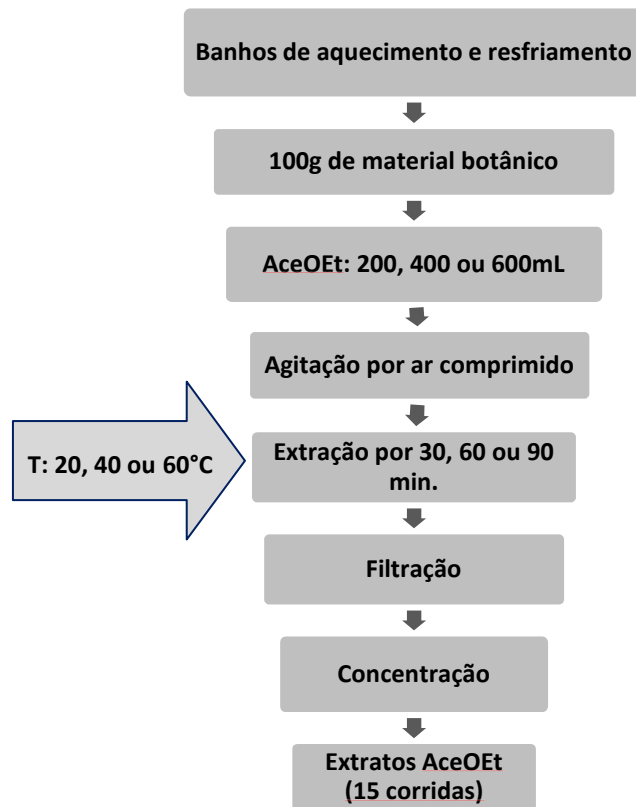


Foto 5 (a) e (b): Extratos AcOEt obtidos das cascas do caule de *Croton palanostigma*.



4.2.4 Metodologia utilizada no ensaio de atividade alelopática

Os bioensaios de germinação de sementes com os extratos AcOEt de *C. palanostigma* foram realizados frente à duas plantas invasoras de pastagens características da região amazônica, *Mimosa pudica* (malícia) e a *Senna obtusifolia* (mata-pasto).

Fotografia 6: *Mimosa pudica* (a) e *Senna obtusifolia* (b).



FONTE:

(a) <http://zeliacorreaguardiano.blogspot.com.br/2011/07/dormideira.html>

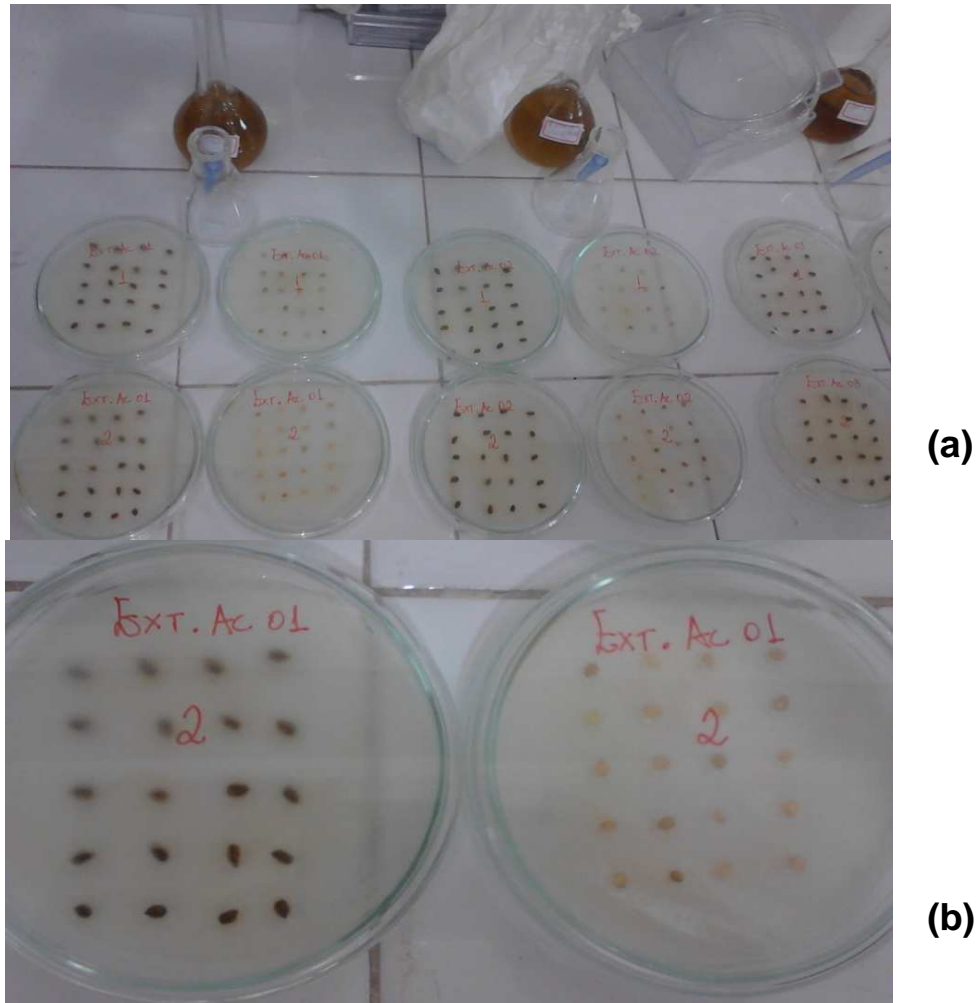
(b) <http://www.flickr.com/photos/8334337@N03/3779074126/>

Todos os ensaios de atividade alelopática foram realizados no Laboratório de Agroindústria da Embrapa-PA, Amazônia ocidental, sob a orientação do Dr. Antônio Pedro da S. Souza Filho.

Os extratos AcOEt de *Croton palanostigma* foram solubilizados em acetona, na proporção de 1% (m/v). Para cada extrato foram utilizadas duas placas de petri, contidas com papel de filtro. Em sequência, foram adicionados 3 mL de extrato em cada placa, juntamente com uma solução antifúngica (a base de antibiótico, Nistatina). Após a evaporação do solvente as placas receberam 15 sementes de cada uma das plantas invasoras de pastagem, paralelamente, sendo uma espécie por placa (Fotografia 7, p. 53). Vale-se ressaltar que os ensaios foram realizados em duplicata para cada espécie de semente.

Uma prova em branco foi realizada utilizando água destilada, juntamente com a solução antifúngica, para desenvolver a base de cálculo de percentual de inibição de germinação das sementes.

Foto 7 (a) e (b): Placas de Petri com as sementes pré-germinadas.



As placas de Petri foram colocadas em câmara de germinação à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. Durante cinco dias as sementes foram monitoradas para a verificação de germinação. Ao final do deste período foi efetuada a contagem das sementes não germinadas e a partir desses dados foi realizado o tratamento estatístico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos de extração das cascas do caule de *Croton palanostigma* foram realizados com base na metodologia de superfície de respostas utilizando o planejamento de Box-Behnken (1960), onde cada fator é estudado em três níveis (+1, 0 e -1) com três réplicas no ponto central, totalizando 15 corridas. As análises estatísticas foram efetuadas com auxílio do Software *Statistica 7.0* (2004).

As corridas foram realizadas de acordo com a matriz de planejamento, descritos na Tabela 5, em que são apresentadas as variáveis de entrada (reais e codificadas com seus respectivos níveis) e a resposta rendimento – Rd (%), correspondentes a cada ensaio. As corridas foram planejadas em uma matriz de forma padronizada e aleatória.

Tabela 5: Matriz de experimentos e resposta Rd (%).

CORRIDAS	Variável codificada			Variável real (unidade)			Resposta
	X ₁	X ₂	X ₃	T(°C)	T(min)	Relação M/S (g/mL)	Rd (%)
1	-1	-1	0	20	30	1:4	7,80
2	1	-1	0	60	30	1:4	3,52
3	-1	1	0	20	90	1:4	4,31
4	1	1	0	60	90	1:4	4,13
5	-1	0	-1	20	60	1:2	2,33
6	1	0	-1	60	60	1:2	3,91
7	-1	0	1	20	60	1:6	4,62
8	1	0	1	60	60	1:6	2,70
9	0	-1	-1	40	30	1:2	1,63
10	0	1	-1	40	90	1:2	3,15
11	0	-1	1	40	30	1:6	5,70
12	0	1	1	40	90	1:6	8,15
13	0	0	0	40	60	1:4	3,34
14	0	0	0	40	60	1:4	4,34
15	0	0	0	40	60	1:4	2,92

X₁: Temperatura (°C); X₂: Tempo, de extração (min.); X₃: Relação massa de material por volume de solvente (adm); Rd: rendimento da extração (%).

Por se tratar de análise de produtos naturais, em que engloba uma série de fatores que possibilitam falhas, como alterações na matéria prima, armazenamento, umidade, questões estruturais, etc. Para planejamento experimental e análise e na interpretação dos dados foi considerado um nível de confiança de 90% (probabilidade de significância $p = 0,10$) com determinação do erro puro.

5.2 PARA A RESPOSTA RENDIMENTO DOS EXTRATOS – Rd (%).

Observa-se na Tabela 6 que os valores mínimo e máximo do rendimento dos extratos de *Croton palanostigma* foram: 1,63 e 8,15%, obtidos nas corridas 9 e 12, respectivamente, com média de 4,2% de Rd(%).

5.2.1 Influência das variáveis operacionais de entrada na resposta rendimento dos extratos – Rd (%).

Considerando 90% de confiança, e probabilidade de significância $p = 0,10$.

5.2.1.1 Efeitos principais e interações

Tabela 6: Efeitos estimados e de interação para a resposta Rd (%)

Efeitos estimados				
Fatores codificados	Efeito	Erro padrão	Coeficiente	Erros dos coeficientes
Média/interação	4,32936	0,210444	4,329358	0,210444
X₁	-1,20033	0,515481	-0,600163	0,257740
X₁²	-0,06895	0,379384	-0,034477	0,189692
X₂	0,26888	0,515481	0,134438	0,257740
X₂²	-1,33970	0,379384	-0,669852	0,189692
X₃	2,53825	0,515481	1,269125	0,257740
X₃²	0,21302	0,379384	0,106510	0,189692
X₁X₂	2,04975	0,729000	1,024875	0,364500
X₁X₃	-1,75060	0,729000	-0,875300	0,364500
X₂X₃	0,46710	0,729000	0,233550	0,364500

Observam-se os efeitos estimados dos fatores de entrada em relação à resposta rendimento, de acordo com a Tabela 6, dentro do domínio experimental em que foi executado, que o fator de entrada X₃ linear apresentou significância para Rd,

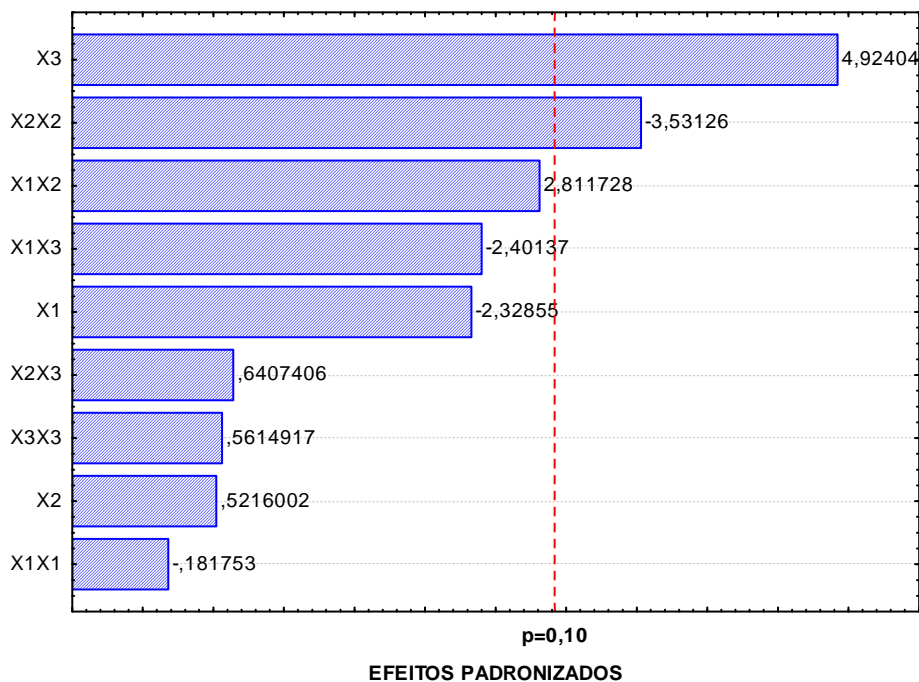
devido o seu efeito ser maior de que em comparativo com o erro padrão, evidenciando que esse não ocorre simplesmente a erros operacionais, mas sim de efeito considerável na resposta devido às modificações em seu nível. A variável X_3 proporcionou um efeito positivo na resposta, sendo estatisticamente significativa para o rendimento da extração.

Isto é, aumentando-se os níveis, do mais baixo (-1) ao mais alto (+1), da variável independente X_3 promove-se um aumento, em média, de 2,54% no rendimento da extração, o que é desejável para a resposta.

5.2.1.2 Gráfico de Pareto

O gráfico de Pareto descreve os efeitos estimados padronizados (razão entre os efeitos estimados e o desvio padrão correspondente) que cada variável exerce na resposta avaliada. A linha vertical que corta os efeitos é indicativa do limite de rejeição da hipótese nula ($p = 0,10$), devendo assim ser considerados, para a avaliação da resposta, apenas os efeitos localizados a direita desta reta.

Gráfico 1: Diagrama de Pareto dos efeitos individuais e combinados em relação à resposta Rendimento - Rd (%).



A análise do gráfico de barras, ou de Pareto (gráfico 1), mostra que as variáveis X_3 (linear) e X_2^2 (quadrática) são significativas, pois esses fatores se apresentam à direita da reta vertical indicativa do limite de rejeição da hipótese nula ($p = 0,10$).

5.2.1.3 Análise de Variância (ANOVA)

Para a confirmação da significância estatística dos efeitos das variáveis de entrada na resposta realizou-se uma análise de variância (ANOVA) conforme ilustrado na Tabela 7, que consiste de uma análise com mais propriedade do efeito das variáveis de entrada sobre a resposta Rendimento – Rd (%).

Na ANOVA a estatística p indica a probabilidade que cada variável possui de não ser considerada estatisticamente significativa para a variável de resposta, ou seja, de estar dentro da região de aceitação de hipótese nula, situação na qual os efeitos são considerados apenas ruído ou erros aleatórios, ou seja, estatisticamente não significativos.

Na Tabela 7 verifica-se que as variáveis X_3 e X_2^2 estão fora da região de hipótese nula para a confiança de 90% ($p < 0,10$). O que confirma que essas variáveis operacionais de entrada têm influencia significativa no rendimento da extração.

As variáveis individuais X_1 , X_2 , X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 e a interação dos efeitos lineares e quadráticos para as três variáveis individuais X_1 e X_2 , estão dentro da região de hipótese nula para a confiança de 90% ($p < 0,10$).

Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) para Rd (%).

Efeitos	SQ	GL	MQ	F	p
X_1	2,88156	1	2,88156	5,42216	0,145286
X_1^2	0,01756	1	0,01756	0,03303	0,872530
X_2	0,14459	1	0,14459	0,27207	0,653959
X_2^2	6,62698	1	6,62698	12,46983	0,071678
X_3	12,88543	1	12,88543	24,24619	0,038856
X_3^2	0,16755	1	0,16755	0,31527	0,630986
X_1X_2	4,20148	1	4,20148	7,90581	0,106637
X_1X_3	3,06460	1	3,06460	5,76658	0,138323
X_2X_3	0,21818	1	0,21818	0,41055	0,587310
Falta de ajuste	15,99054	3	5,33018	10,02967	0,092018
Erro puro	1,06288	2	0,53144		
Total	47,44780	14			

SQ: Soma quadrática; **GL:** Grau de liberdade; **MQ:** Média quadrática; **F:** Estatística de Fisher; **p:** probabilidade de significância ou valor descritivo.

A variável X_2 na forma quadrática apresentou significância na resposta rendimento, entretanto, apresentando efeito negativo para a resposta.

Com base na estatística de Fisher, o valor de F calculado ($F_{0,10; 3,2}=10,02967$) é maior que o valor de F crítico ($F_{0,10; 3; 2} = 9,16$), conforme valor tabelado em Box, Hunter e Hunter (1978), indicando que não há falta de ajuste para o modelo proposto.

5.2.1.4 Modelo proposto

A partir do tratamento estatístico é apresentado o modelo polinomial de segunda ordem que expressa a influência das variáveis independentes para a resposta rendimento (modelo completo), com base nos coeficientes de regressão e na análise de resíduos.

Empregando-se o método dos mínimos quadrados, constante no aplicativo *Statistica 7.0*, são estimados os coeficientes de regressão do modelo polinomial proposto resposta RD (Equação 1), em função das variáveis operacionais de entrada codificadas (Tabela 5). O modelo a seguir trata-se do modelo completo.

$$RD = 4,3294 - 0,6001X_1 - 0,0345X_2 + 0,1344X_3 - 0,6698X_1X_2 - 1,2691X_1X_3 + 0,1065X_2X_3 - 1,0249X_1^2 - 0,8753X_2^2 + 0,2335X_3^2 \quad (1)$$

Onde os valores de X_1 , X_2 e X_3 são correlacionados com as variáveis originais, através das Equações 2, 3 e 4, respectivamente:

$$X_1 = \frac{T-40}{20} \quad (2)$$

$$X_2 = \frac{t-60}{30} \quad (3)$$

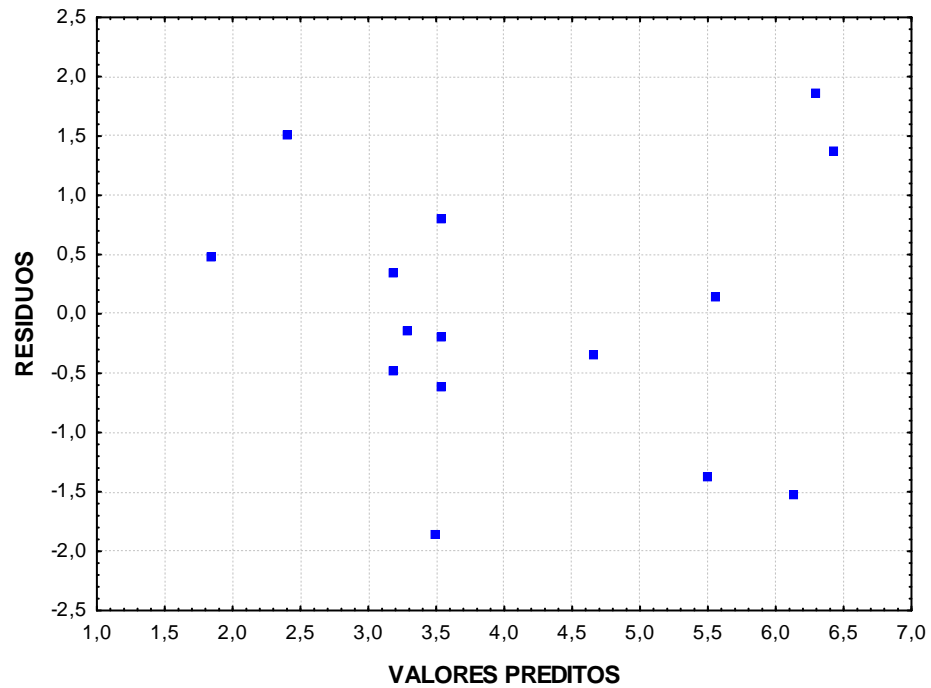
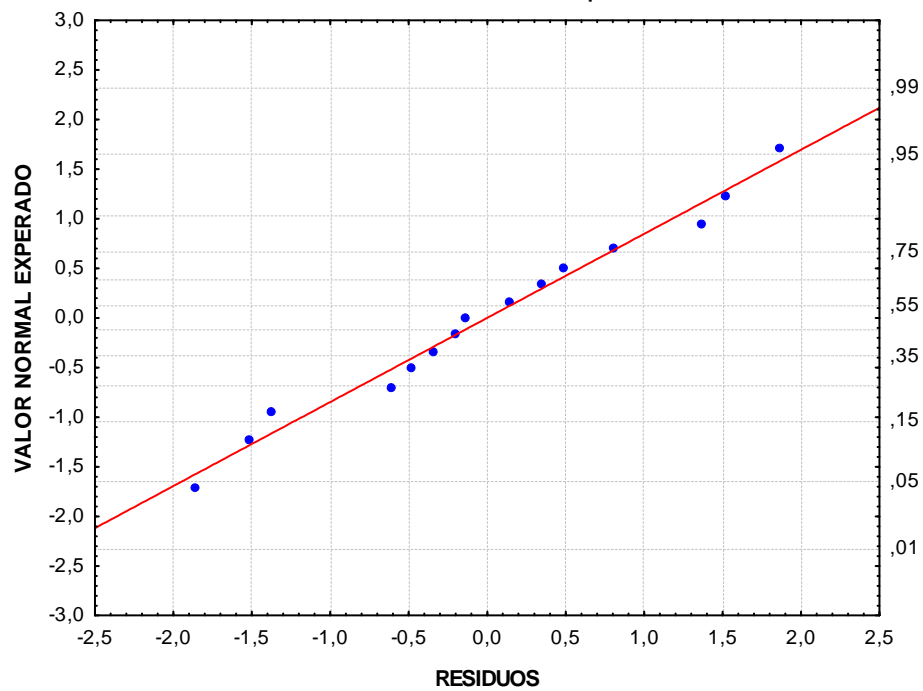
$$X_3 = \frac{MS-400}{200} \quad (4)$$

O coeficiente de determinação obtido foi $R^2 = 0,6408$, a partir do modelo completo, indicando que o modelo proposto é capaz de explicar cerca de 64% das variabilidades experimentais, de 97,76% de variância explicável (ver apêndice). Descrevendo modelo de forma razoável.

5.2.1.5 Análise de resíduos

A análise de resíduos é realizada com base no gráfico 2. Observa-se que os resíduos são relativamente baixos e sua distribuição em torno do zero apresenta comportamento aleatório, mostrando que os mesmos são independentes dos valores preditos e que a variância pode ser considerada constante.

No gráfico de probabilidade normal dos resíduos (Gráfico 3) nota-se que os pontos encontram-se localizados próximos e ao longo de uma reta, o que indica que os componentes de erro do modelo proposto seguem uma distribuição normal para a resposta Rd.

Gráfico 2: Resíduos *versus* valores preditos para Rd.**Gráfico 3:** Teste de normalidade para os resíduos

De acordo com a Tabela 8 verifica-se que os resíduos são relativamente baixos e situam-se na faixa de -1,85654 a 1,85654.

Tabela 8: Faixa de resíduos.

Valores observados	Valores preditos	Resíduos
7,802200	6,431525	1,37068
3,522600	3,181450	0,34115
4,309500	4,650650	-0,34115
4,129400	5,500075	-1,37067
2,329800	1,843937	0,48586
3,909600	2,394212	1,51539
4,617400	6,132787	-1,51539
2,696000	3,181862	-0,48586
1,632400	3,488937	-1,85654
3,146000	3,290713	-0,14471
5,704800	5,560087	0,14471
8,152600	6,296062	1,85654
3,335000	3,532267	-0,19727
4,339600	3,532267	0,80733
2,922200	3,532267	-0,61007

5.2.1.6 Análise da superfície de resposta e contornos

Nas representações gráficas a seguir está apresentada a superfície de resposta e as correspondentes curvas de nível ou contornos em função das variáveis codificadas. Nestes gráficos têm-se uma melhor visualização do ponto ótimo de operação para o rendimento em massa dos extratos obtidos da casca do caule de *Croton palanostigma*.

A superfície de resposta foi determinada em função de X_3 que foi a única variável significativa no processo em relação ao rendimento (Rd-%). Analisando em conjunto, pode-se trabalhar com valores mínimos de X_1 e X_2 desde que os valores de X_3 permaneçam ao máximo.

Gráfico 4: Superfície de resposta para a resposta **Rd (%)**, X_1 versus X_2 , com $X_3=1$.

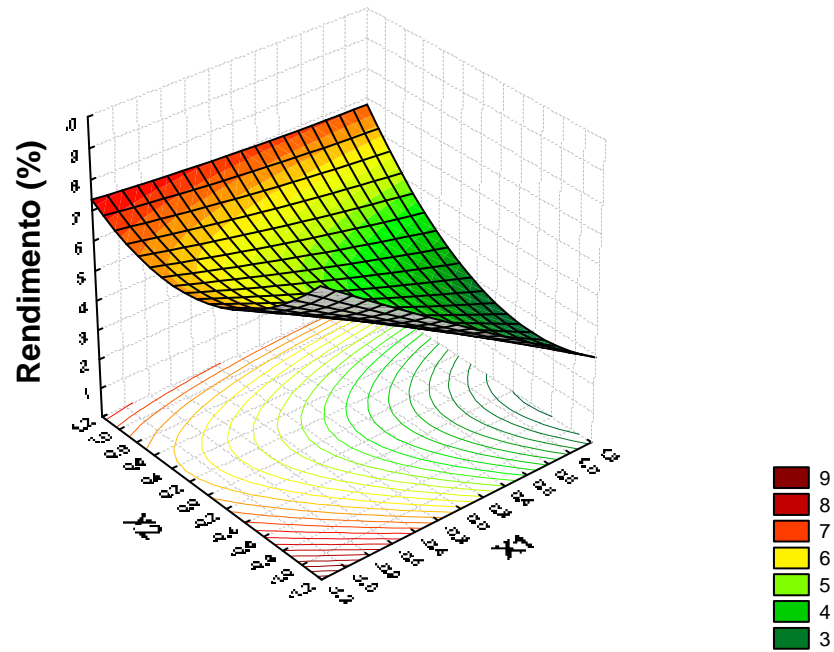
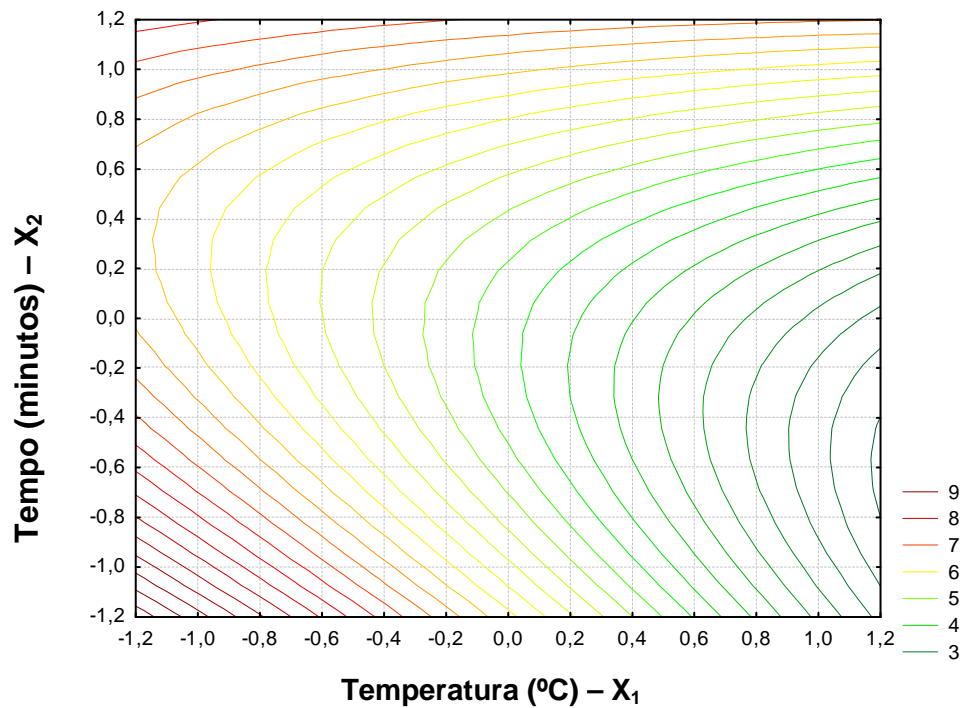


Gráfico 5: Curva de nível para a resposta **Rd (%)**, X_1 versus X_2 , com $X_3=1$.



Os Gráficos 4 e 5 correspondem à superfície formada pela a interação das variáveis X_1 e X_2 com a variável $X_3=1$. Para obter-se um ponto ótimo em relação ao rendimento, mantém-se o valor de $X_3= +1$ (máximo), e o valor de $X_2= -1$ (mínimo) ou $X_2=+1$ (máximo), ou seja, a relação M/S deve ser 1:6, para um tempo mínimo de extração (30 minutos). Por exemplo, na Relação M/S em +1 e Tempo de extração em -1, mantendo a temperatura de extração no valor mínimo -1, obtém-se o maior valor na resposta Rd de aproximadamente 9%.

5.3 RESULTADOS DOS ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA COM OS EXTRATOS DE *Croton palanostigma*.

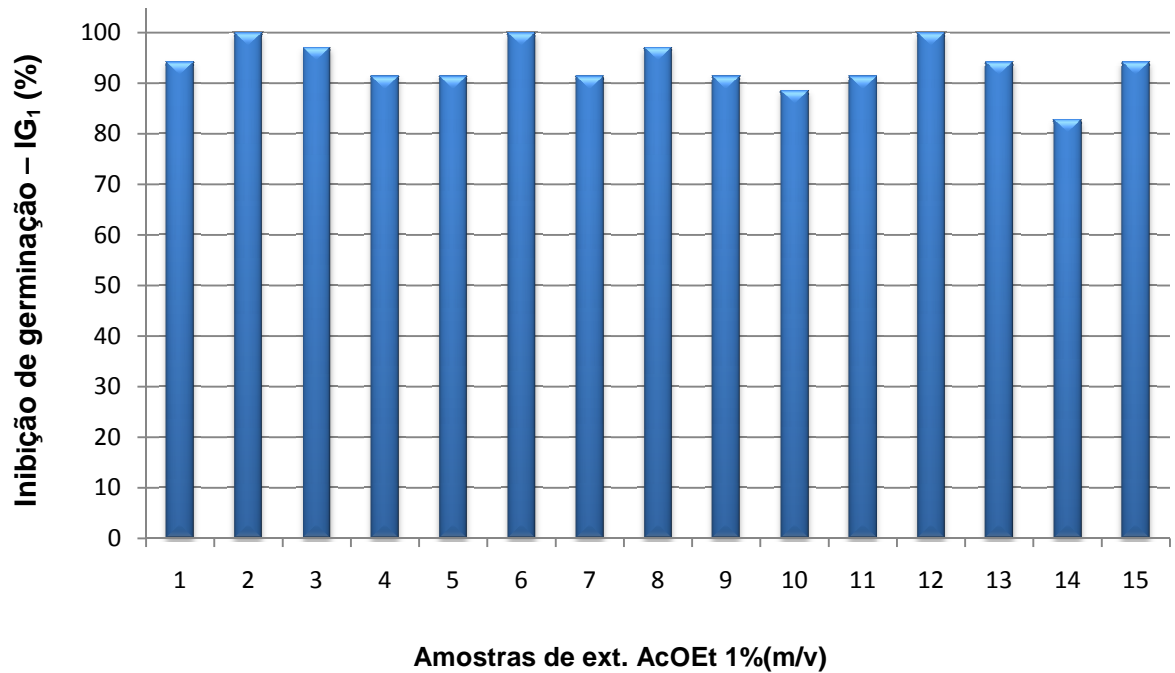
Os resultados dos ensaios sobre a germinação de sementes com os extratos AcOEt de *Croton palanostigma* são expressos em valores percentuais em relação a uma prova em branco (testemunha) a base de água destilada.

Resultados de análise alelopática, a caráter de inibição da germinação dessas sementes, são expressos em percentual de inibição (IG%). Resultados acima de cinquenta por cento (IG >50%), apresentam significância na atividade alelopática. A prova em branco desenvolvida para o ensaio frente às duas espécies tiveram resultados de 87,5% de inibição para *Mimosa pudica*, e 90% para *Senna obtusifolia*.

5.3.1 Resultados para avaliação de inibição de germinação de sementes para *Mimosa pudica* – IG₁(%):

Nos resultados observa-se que à espécie *Mimosa pudica*, os extratos testados demonstraram resultado positivo à atividade alelopática, o que é indicativo de que a planta Malícia é sensível consideravelmente aos ensaios de germinação, frente a esses extratos. Todos os resultados foram acima de cinquenta por cento.

Gráfico 6: Efeitos dos extratos (1% m/v) em acetato de etila das cascas do caule de *Croton palanostigma* sobre a germinação de sementes de *Mimosa pudica*.



5.3.1.1 Efeitos estimados para IG₁(%)

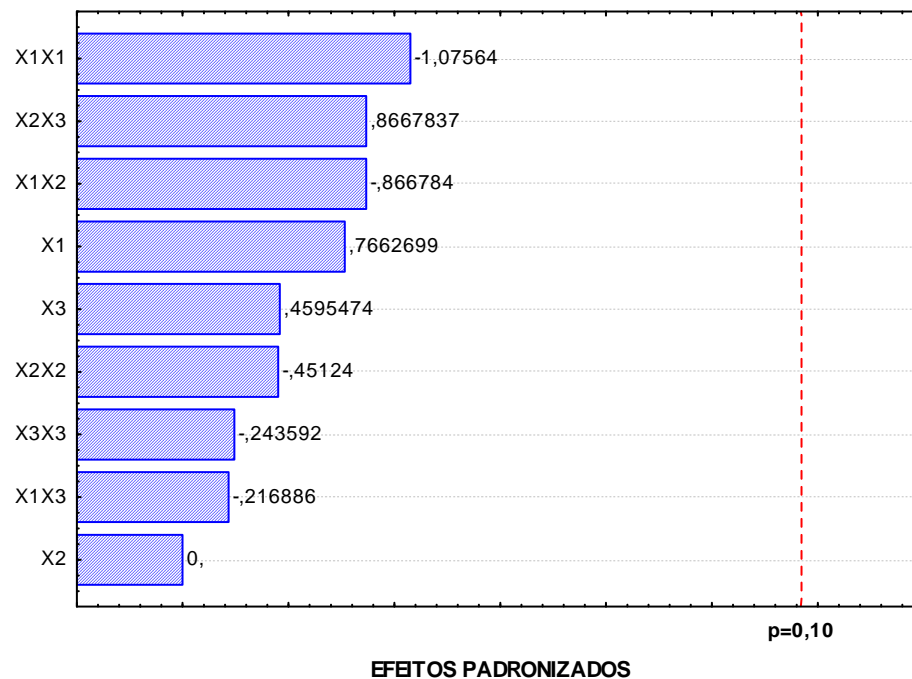
Tabela 9: efeitos estimados para a resposta IG₁(%)

Efeitos estimados				
Fatores codificados	Efeito	Erro padrão	Coefficiente	Erros dos coeficientes
Média/interação	94,52333	1,903333	94,52333	1,903333
X₁	3,57250	4,662195	1,78625	2,331098
X₁²	-3,69083	3,431283	-1,84542	1,715641
X₂	0,00000	4,662195	0,00000	2,331098
X₂²	-1,54833	3,431283	-0,77417	1,715641
X₃	2,14250	4,662195	1,07125	2,331098
X₃³	-0,83583	3,431283	-0,41792	1,715641
X₁X₂	-5,71500	6,593340	-2,85750	3,296670
X₁X₃	-1,43000	6,593340	-0,71500	3,296670
X₂X₃	5,71500	6,593340	2,85750	3,296670

5.3.1.2. Gráfico de Pareto.

A análise do gráfico de barras para a resposta $IG_1(\%)$ confirma que as variáveis de entrada não foram significativas para esse processo, pois esses fatores se apresentam à esquerda da reta vertical indicativa do limite de rejeição da hipótese nula ($p = 0,10$).

Gráfico 7: Diagrama de Pareto dos efeitos em relação à resposta $IG_1(\%)$



5.3.1.3. Análise de variância (ANOVA)

De acordo com a Tabela 10, estão relatados os efeitos das variáveis de entrada sobre a Inibição de germinação – $IG_1(\%)$ para *Mimosa pudica*. Verifica-se que todas as variáveis estão dentro da região de hipótese nula para a confiança de 90% ($p < 0,10$). Isto é, nenhuma apresentou efeitos significativos na resposta $IG_1(\%)$.

Os extratos das cascas caule de *Croton palanostigma* apresentaram ótimos resultados frente à espécie *Mimosa pudica*. Contudo, a análise de variância demonstra que nenhuma das variáveis operacionais de entrada apresentou diferencial significativo na resposta $IG_1(\%)$. Isto é, os resultados dos ensaios alelopático foram expressivos de *Croton palanostigma* frente à essa espécie,

contudo, as variáveis operacionais de entrada não tiveram efeitos significativos para essa resposta.

Tabela 10: análise de variância (ANOVA) para IG₁.

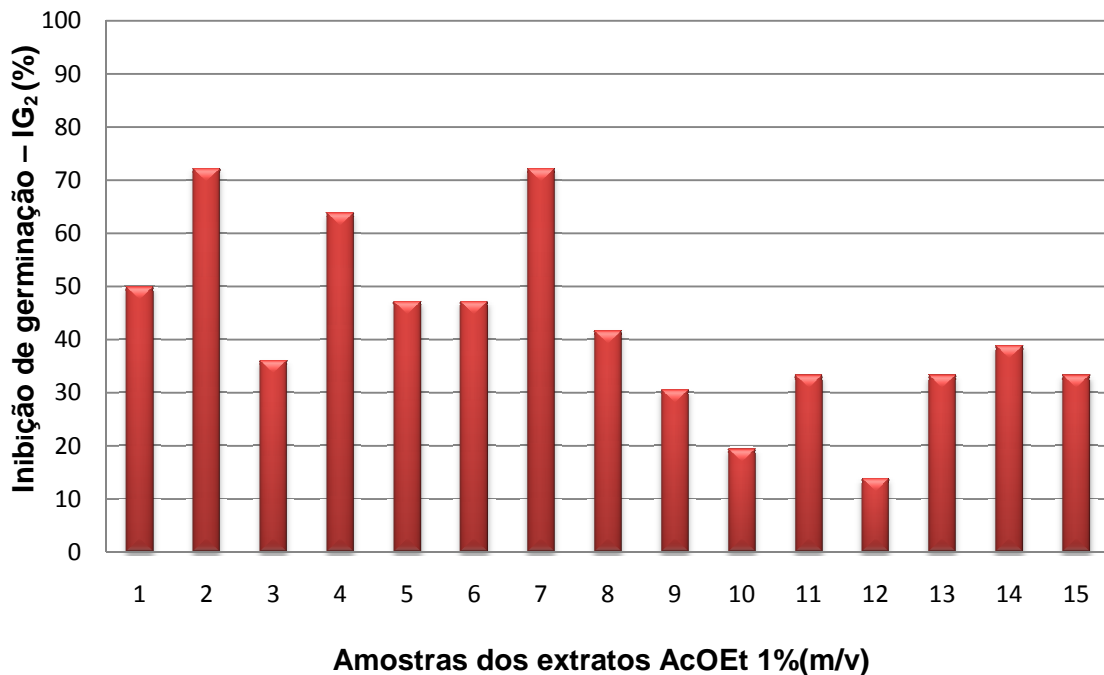
Efeitos	SQ	GL	MQ	F	p
X ₁	50,2975	1	25,52551	0,587170	0,523603
X ₁ ²	0,0000	1	50,29754	1,157007	0,394617
X ₂	8,8517	1	0,00000	0,000000	1,000000
X ₂ ²	9,1806	1	8,85170	0,203618	0,696024
X ₃	2,5795	1	9,18061	0,211184	0,690958
X ₃ ³	32,6612	1	2,57951	0,059337	0,830254
X ₁ X ₂	2,0449	1	32,66122	0,751314	0,477435
X ₁ X ₃	32,6612	1	2,04490	0,047039	0,848411
X ₂ X ₃	67,2817	1	32,66123	0,751314	0,477435
Falta de ajuste	86,9443	3	22,42722	0,515899	0,711856
Erro puro	313,3307	2	43,47213		
Total	50,2975	14			

SQ: Soma quadrática; **GL:** Grau de liberdade; **MQ:** Média quadrática; **F:** Estatística de Fisher; **p:** probabilidade de significância ou valor descritivo. O valor de F calculado ($F_{0,10; 3; 2} = 0,515899$) é menor que o valor de F crítico ($F_{0,10; 3; 2} = 9,16$), conforme valor tabelado em Box, Hunter e Hunter (1978).

5.3.2 Resultados para avaliação de inibição de germinação de sementes para *Senna obtusifolia* – IG₂(%):

Nos resultados observa-se que frente à espécie *Senna obtusifolia*, apenas os extratos 01, 02, 04 e 07 testados apresentaram inibição acima de 50% à atividade alelopática, em termos de inibição, o que é indicativo de que a planta Mata-pasto é menos sensível, frente a esses extratos.

Gráfico 8: Efeitos dos extratos (1% m/v) em Acetato de etila das cascas do caule de *Croton palanostigma* sobre a germinação de sementes de *Senna obtusifolia*.



5.3.2.1 Efeitos estimados

Tabela 11: efeitos estimados para a resposta IG₂(%)

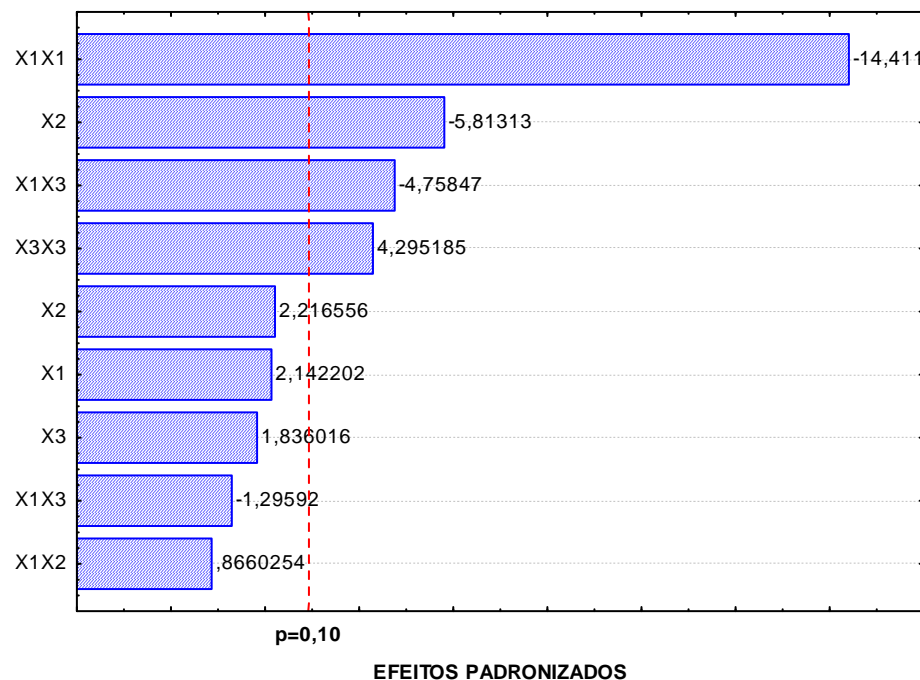
Efeitos estimados				
Fatores codificados	Efeito	Erro padrão	Coeficiente	Erros dos coeficientes
Média/interação	43,9808	0,926667	43,9808	0,926667
X₁	4,8625	2,269860	2,4313	1,134930
X₁²	-24,0746	1,670572	-12,0373	0,835286
X₂	-13,1950	2,269860	-6,5975	1,134930
X₂²	3,7029	1,670572	1,8515	0,835286
X₃	4,1675	2,269860	2,0838	1,134930
X₃²	7,1754	1,670572	3,5877	0,835286
X₁X₂	2,7800	3,210067	1,3900	1,605034
X₁X₃	-15,2750	3,210067	-7,6375	1,605034
X₂X₃	-4,1600	3,210067	-2,0800	1,605034

Em primeira análise, observa-se que as variáveis individuais X_1^2 , X_2 e a interação X_1X_3 têm significância estatística para a resposta $IG_2(\%)$, pois seus efeitos, em módulo, são maiores quando comparados ao erro, evidenciando que estes efeitos não ocorrem simplesmente devido a erros experimentais ou simplesmente aleatórios. Todas variáveis significativas e interações apresentaram efeito negativo na resposta. Em relação à variável X_3^2 foi a única que apresentou efeito positivo para a resposta.

5.3.2.2. Gráfico de Pareto.

A análise do gráfico de barras, ou de Pareto (Gráfico 9) indica que as variáveis individuais X_1^2 , X_2 , X_3^2 e a interação X_1X_3 , já que somente estas aparecem à direita da reta vertical indicativa do limite de rejeição da hipótese nula ($p = 0,10$).

Gráfico 9: Diagrama de Pareto para a resposta $IG_2(\%)$.



5.3.2.3 Análise de Variância (ANOVA)

Para a análise da significância estatística dos efeitos das variáveis de entrada na resposta $IG_2(\%)$ realizou-se a análise de variância de acordo com a Tabela 12 que confirma as variáveis individuais X_1^2 , X_2 , X_3^2 e a interação X_1X_3 tem a probabilidade menor que 10% ($\alpha = 0,10$), dentro do limite de aceitação da hipótese

nula (H_0), ou seja, efeitos sem significância de acordo com o nível de confiabilidade estipulado, portanto, em conformidade com as conclusões anteriores.

O valor de F calculado ($F_{0,10; 3; 2}=28,5151$) é maior que o valor de F crítico ($F_{0,10; 3; 2}=9,16$), conforme valor tabelado em Box, Hunter e Hunter (1978). Logo, o modelo não apresenta falta de ajuste.

Tabela 12: Análise de variância (ANOVA) para a resposta $IG_2(\%)$.

Efeitos	SQ	GL	MQ	F	p
X_1	47,288	1	47,288	4,5890	0,165455
X_1^2	2140,008	1	2140,008	207,6764	0,004781
X_2	348,216	1	348,216	33,7925	0,028340
X_2^2	50,627	1	50,627	4,9131	0,156973
X_3	34,736	1	34,736	3,3710	0,207771
X_3^3	190,104	1	190,104	18,4486	0,050161
X_1X_2	7,728	1	7,728	0,7500	0,477767
X_1X_3	233,326	1	233,326	22,6430	0,041438
X_2X_3	17,306	1	17,306	1,6794	0,324400
Falta de ajuste	881,504	3	293,835	28,5151	0,034072
Erro puro	20,609	2	10,305		
Total	4123,410	14			

5.3.2.4. Modelo proposto

A partir do tratamento estatístico é apresentado o modelo polinomial de segunda ordem que expressa a influência das variáveis independentes para a resposta IG_2 com base nos coeficientes de regressão.

Empregando-se o método dos mínimos quadrados, constante no aplicativo *Statistica 7.0*, são estimados os coeficientes de regressão do modelo polinomial proposto resposta IG_2 (Equação 1), em função das variáveis operacionais de entrada codificadas. O modelo gerado a partir das variáveis significativas para a resposta IG_2 :

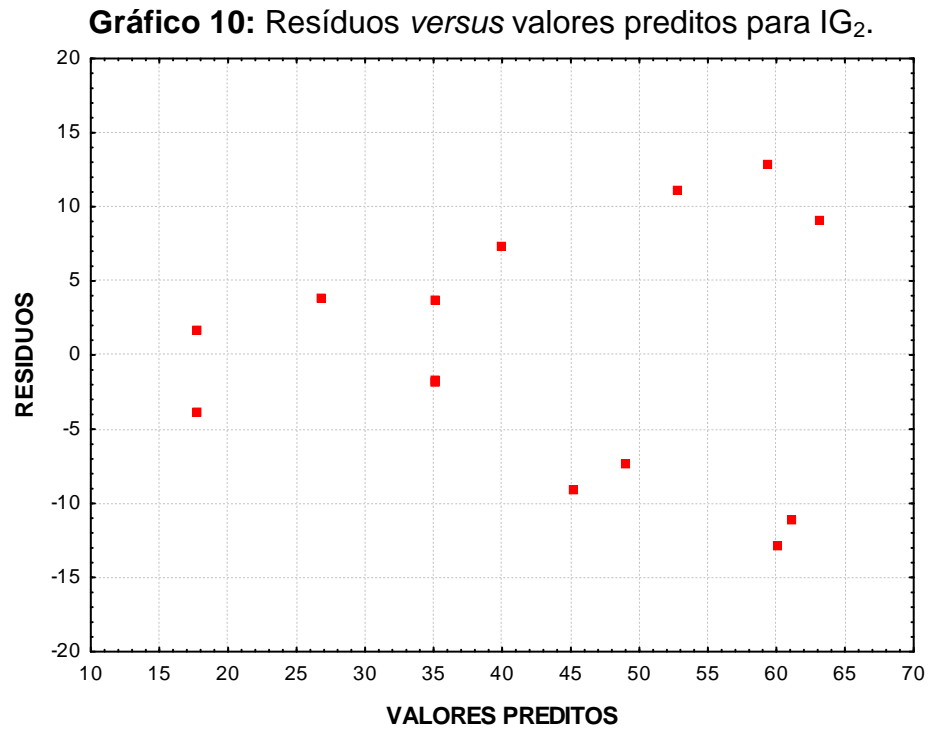
$$IG_2 = 43,9808 - 6,5975X_2 - 7,6375X_1X_3 - 12,0373X_1^2 + 3,5877X_3^2$$

$$R^2 = 0,74298$$

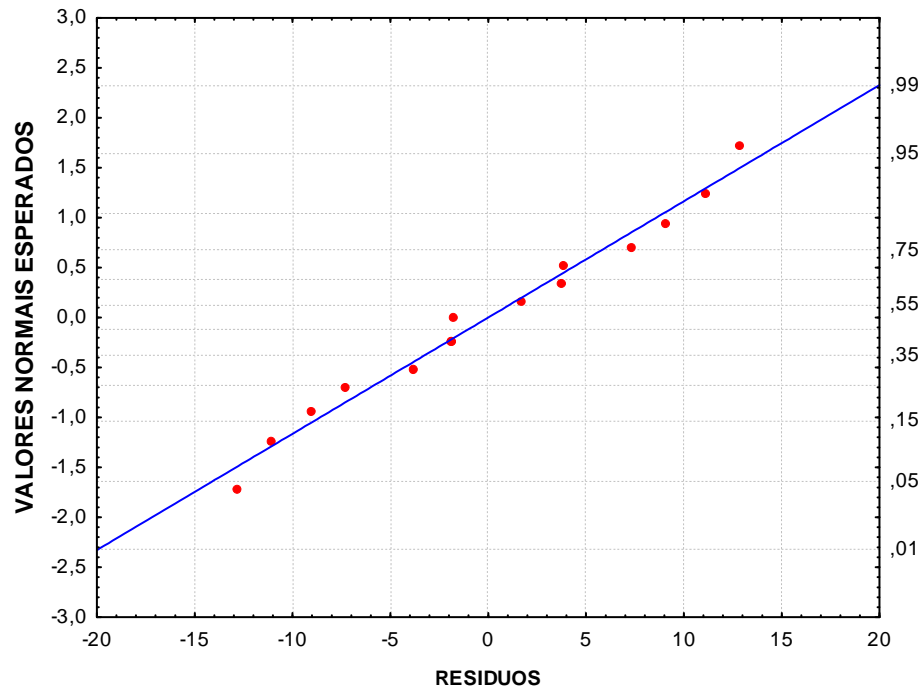
Explica cerca de 74,30% das variabilidades experimentais.

5.3.2.5 Análise de resíduos

A análise de resíduos é realizada com base no Gráfico 10. Observa-se que os resíduos são relativamente baixos e sua distribuição em torno do zero apresenta comportamento aleatório, mostrando que os mesmos são independentes dos valores preditos e que a variância pode ser considerada constante.



No gráfico de probabilidade normal dos resíduos (Gráfico 11) nota-se que os pontos encontram-se localizados muito próximos e ao longo de uma reta, o que indica que os componentes de erro do modelo proposto seguem uma distribuição normal para a resposta IG_2 .

Gráfico 11: teste de normalidade dos resíduos para IG₂.

Na Tabela 13 estão descritos os valores da faixa de resíduos para IG₂.

Tabela 13: faixa de resíduos.

Valores observados	Valores preditos	Resíduos
60,00000	61,11125	1,1112
72,22000	63,19375	9,0263
36,11000	45,13625	-9,0262
63,89000	52,77875	11,1113
47,22000	39,93000	7,2900
47,22000	60,06750	-12,8475
72,22000	59,37250	12,8475
41,67000	48,96000	-7,2900
30,56000	26,73875	3,8213
19,44000	17,70375	1,7362
33,33000	35,06625	-1,7362
13,89000	17,71125	-3,8212
33,33000	35,18333	-1,8533
38,89000	35,18333	3,7067
33,33000	35,18333	-1,8533

5.3.2.6 Análise da superfície de resposta e contornos

A superfície de resposta e as correspondentes curvas de nível ou contornos estão são ilustradas a seguir em função das variáveis codificadas. Nos gráficos têm-se uma melhor visualização do ponto ótimo de operação para a resposta IG_2 .

Os Gráficos 12 e 13 ilustram a superfície de resposta através da interação entre X_1 e X_2 que apresentaram efeitos significativos na resposta IG_2 , sendo o valor de X_3 fixado no valor máximo, pois essa variável individual na forma quadrática influencia positivamente na resposta.

Gráfico 12: Superfície de resposta para IG_2 , X_1 versus X_2 ($X_3=1$).

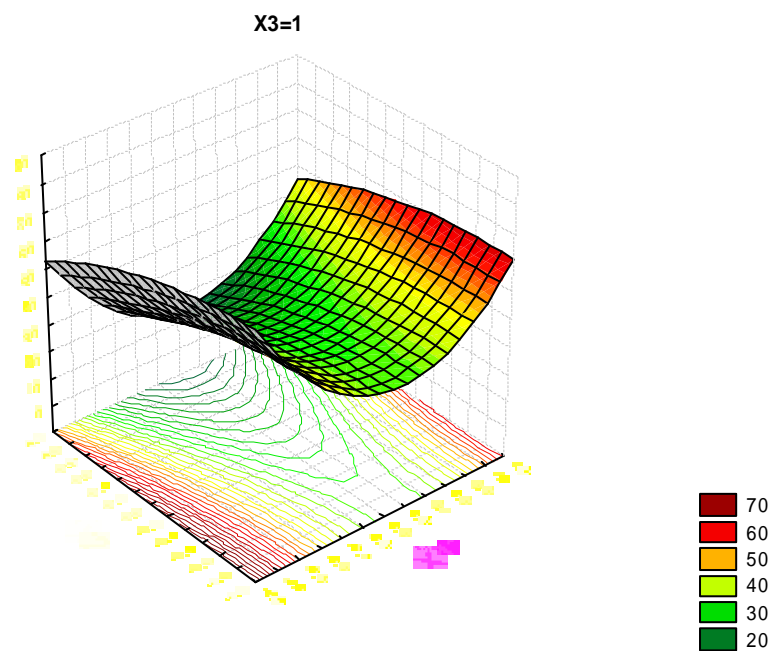
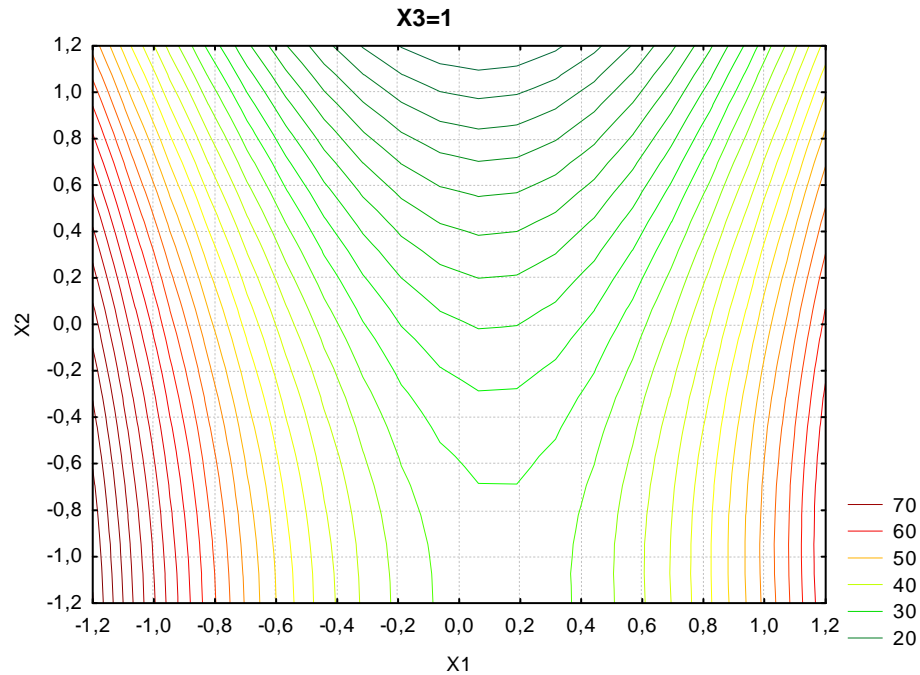


Gráfico 13: Curva de nível para IG_2 , X_1 versus X_2 ($X_3=1$).



Os Gráficos 12 e 13 correspondem à superfície formada pela interação das variáveis X_1 e X_2 com a variável $X_3=+1$. Para obter-se um ponto ótimo em relação à resposta IG_2 , mantém-se o valor de X_1 e X_2 no nível mínimo (-1). Ou seja, os fatores de entrada Temperatura e tempo de extração podem ser executados em 20°C e 30 minutos respectivamente, e a relação de massa por carga de solvente em 1:6, para obter em torno de 70% na resposta IG_2 .

5.4 OTIMIZAÇÃO VIA FUNÇÃO DESEJABILIDADE

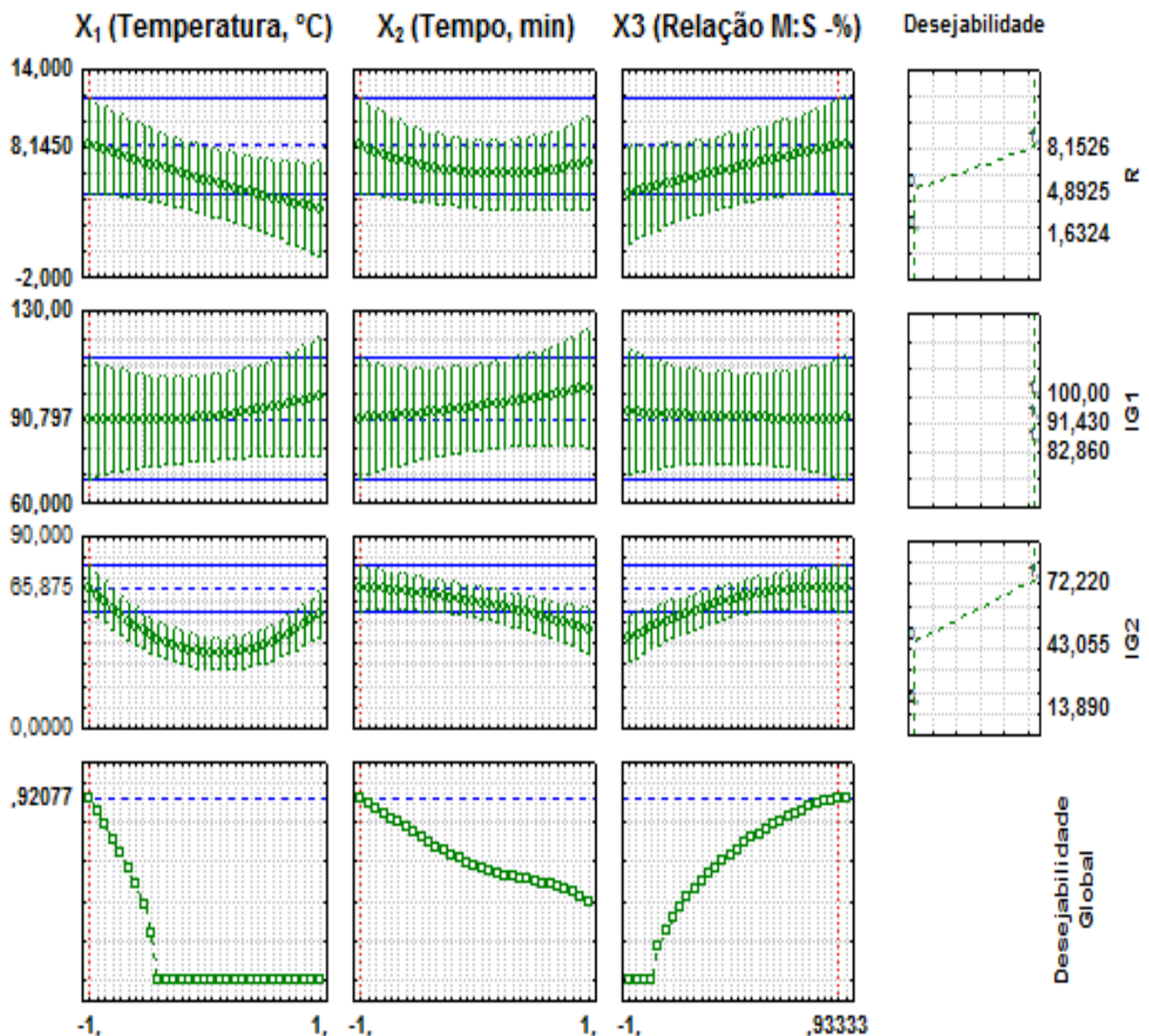
Para a análise de desejabilidade global foi utilizado o software *Statistica*® 7.0, utilizando uma grade de 30 pontos para cada uma das 3 variáveis independentes, ou seja, os valores das respostas e respectivas desejabilidades foram calculadas em 30^3 combinações de níveis para os fatores. Para o valor máximo do rendimento, inibição de germinação de malícia (IG_1), inibição de mata-pasto (IG_2), obtidos nos experimentos foi fixado o valor d_i igual a 1. Os demais valores foram considerados inaceitáveis ($d_i=0$). Os expoentes s e t foram iguais a 1. A Tabela 14 mostra as atribuições dos valores na otimização realizada.

Tabela 14: valores atribuídos na otimização via função desejabilidade.

Valores atribuídos na otimização	Condições para as respostas		
	Rd (%)	IG ₁ (%)	IG ₂ (%)
Baixos	1,63	100	72,22
Médios	4,89	91,43	43,06
Altos	8,15	82,86	13,89

O Gráfico 14 mostra os gráficos da função desejabilidade que de maneira satisfatória realiza a otimização das respostas, o que pode ser comprovado pelo resultado da desejabilidade global (D) igual a 0,92077 conseguindo especificar níveis para cada variável de entrada a maximização do rendimento, IG₁ e IG₂. Segundo a classificação de Akhanazarova e Kafarov (1982), Tabela 2, considera-se a resposta aceitável e excelente.

Gráfico 14: representações gráficas da função desejabilidade para as respostas Rd, IG₁ e IG₂.



No Gráfico 14 são apresentadas as condições ótimas na forma codificada que representam os seguintes valores reais: Temperatura de 20°C, tempo de extração de 30 minutos e relação de massa de material/solvente de 1:6 (100 g/600 mL). A partir desses resultados pode-se constatar:

- O rendimento máximo obtido experimentalmente foi de 8,1526% e o calculado pela função desejabilidade foi de 8,1450%;
- A inibição máxima de germinação da espécie malícia obtida experimentalmente foi de 100% e o calculado pela função desejabilidade foi de 90,797%;
- A inibição máxima de germinação da espécie mata-pasto obtida experimentalmente foi de 72,22% e o calculado pela função desejabilidade foi de 65,875%.

CONCLUSÕES

O extrator por solvente utilizado mostrou-se eficaz para extração das cascas do caule da espécie *Croton palanostigma*, para o rendimento em massa dos extratos. Contudo, o seu volume restringe os ensaios para altas quantidades de carga de material e solvente, devido ao seu volume relativamente pequeno para o enfoque desse estudo. Apesar dessa restrição, contribuiu positivamente, para literatura em relação ao estudo de processos de obtenção de extratos botânicos a partir de plantas com propriedades biologicamente úteis.

A metodologia proposta para a extração mostrou-se satisfatória em relação ao estudo da influência das variáveis operacionais de entrada do processo nas respostas de interesse rendimento (Rd), Inibição de germinação de sementes de *Mimosa pudica* e *Senna Obtusifolia* (IG₁ e IG₂ respectivamente).

A partir de experimentos estatisticamente planejados, observou-se um valor máximo de 8,15% para a resposta rendimento de obtenção dos extratos em acetato de etila das cascas do caule de *Croton palanostigma*.

Para a resposta rendimento, em relação às variáveis de entrada no processo Temperatura e tempo de extração, apesar de não serem significativos estatisticamente em relação ao rendimento, os resultados demonstram que se pode trabalhar com valores mínimos dessas variáveis, desde que a relação massa de material botânico (fixa) por carga de solvente - R:M/S - seja máxima, evitando-se, ou até mesmo poupando-se, tempo de execução em cada ensaio e gastos desnecessários.

Os extratos de *Croton palanostigma*, mostraram elevado potencial de inibição nos ensaios de atividade alelopática, sendo que a germinação de sementes da espécie Malícia (*Mimosa pudica*) sofreu inibição expressiva, acima de 50% do índice de inibição de germinação. Em relação a análise de variância, nenhuma variável operacional de entrada apresentou efeito significativo na resposta IG₁(%).

Em relação à espécie Mata-pasto (*Senna obtusifolia*) apenas quatro amostras das quinze corridas submetidos ao ensaio alelopático, apresentaram elevado potencial de inibição acima de 50%.

Para a resposta IG₂, foram significativas as variáveis operacionais de entrada Temperatura (na forma quadrática), tempo de extração (linear), e Relação de massa de material botânico por carga de solvente (na forma quadrática); e a interação entre as variáveis Temperatura e Relação M/S. Contudo, apenas a variável R: M/S, na forma quadrática, apresentou efeito positivo para a resposta.

Dos resultados obtidos dos ensaios alelopáticos realizados com os extratos de *Croton palanostigma*, pode-se a partir desse estudo preliminar investigar o potencial alelopático dos constituintes isolados da espécie.

A análise da desejabilidade global indicou como ponto ótimo do planejamento as seguintes condições de extração: Temperatura de 20°C, tempo de extração de 30 minutos e relação de massa de material/solvente de 1:6 (100 g/600 mL). O valor calculado da desejabilidade global foi de 0,92077, valor considerado aceitável e excelente, proporcionando a correta estimativa do ponto ótimo de operação das variáveis de entrada para obtenção do melhor produto de acordo com os critérios pré-estabelecidos (domínio experimental), constituindo-se numa importante ferramenta no desenvolvimento do processo em questão.

REFERÊNCIAS

AKHNAZAROVA, S.; KAFAROV, V. **Experiment optimization in chemistry and chemical engineering**. Moscow: Mir, 1982.

ALBUQUERQUE, M.B.; VASCONCELOS, F.M.T.; MELO FILHO, P.A.; SANTOS, R.C. **Potencial alelopático dos resíduos de *Croton sonderianus* sobre três ervas daninhas da cultura do algodão**. In: Congresso brasileiro do algodão. Sustentabilidade da cotonicultura Brasileira e Expansão dos Mercados: Anais. Campina grande: EMBRAPA Algodão, 2009. p.1762-1767.

ALMEIDA, F.S. **A alelopatia em plantas**. Londrina: IAPAR, 1988. v.55. 62p. (Circular, 53).

AN, M.; JOHNSON, I. R.; LOVETT, J. V. Mathematical modeling of allelopathy: biological response to allelochemical and its interpretation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n.10, p. 2379-2389, 1993.

ANDRADE, E. L. **Otimização experimental da destilação do óleo essencial de *Piper Aduncum* L. por arraste com vapor**. Dissertação de mestrado em Engenharia Química. Belém: UFPA, 2009.

ANVISA - Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº6 de 31 de janeiro de 1995. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/6_95.htm. Acesso em 05/09/12.

AQUILA, M. E. A. **Efeito alelopático de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. Iheringia (Série Botânica)**, Porto Alegre, v. 53, p. 51-66, 2000.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5 ed. Viçosa, MG: UFV, 2011.

ARELLANO, P. **El libro verde: guía de recursos terapéuticos vegetales**. Lima: Ministerio de Salud, 1992; ESTRELLA, E. **Plantas medicinales amazônicas: tratado de cooperación amazónica**. Lima: Secretaria Pro-Tempore, 1995; MILLER, M.J.S.; MAC NAUGHTON, W.K.; ZHANG, X.J.; THOMPSON, J. H.; CHARBONNET, R. M.; BOBROWSKI, P.; LAO, J.; TRENTACOSTI, A. M.; SANDOVAL, M. Treatment of gastric ulcers and diarrhea with the Amazonian herbal medicine sangre de grado. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, vol. 279, n. 1, p. 192-200, 2000 *apud* AYALA, S.; JURUPE, H.; DÍAZ, D.; LOCK, O.; VEGA, M.; LUQUE, J.; GARNIQUE, M. Efecto protector de látex desecado y fracción alcaloidea de *Croton palanostigma* frente a injuria de mucosa gástrica inducida por etanol en ratas. **Anales de la Facultad de Medicina**, vol. 62, n. 4, p. 317-324, 2001.

AYALA, S.; DÍAZ, D.; PALOMINO, M.; ARMAS, S.; PAZ, J. Efecto protector de *Croton palanostigma* y *Aloe vera* frente a injuria aguda de mucosa gástrica inducida por etanol em ratas. **Anales de la Facultad de Medicina**, v. 60, n. 1, p.22-29, 1999.

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

AYALA, S.; JURUPE, H.; DÍAZ, D.; ORÉ, R.; CÁRDENAS, W.; ESPEJO, L. Efecto protector de *Phthirusa pyrifolia* y *Croton palanostigma* sobre lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas. **Revista Situa**, ano 8, n. 16, p. 12-16, 2000.

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

BERRY, P. E.; HIPPI, A. L. WURDAKCK, K. J.; VAN, E.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and TRNL-TRNF DNA sequence data. **American Journal Botany**, 92, p.1520-1534. 2005.

BITTNER, M. et al. Estudio químico de especies de La familia Euphorbiaceae em Chile. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v.46, p.1-15, 2001.

BLACKADDER D. A.; NEDDERMAN R. M. Extração de Solvente. In: Manual de Operações Unitárias. Rio de Janeiro: hemus editora LTDA, p. 69-106, 1982.

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

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new Three level Design for the Study of quantitative Variable. **Tecnometrics**, v. 1, p. 445-476, 1960.

BOX, G. E. P., HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: An introduction to designs, data analysis and model building**. Wiley. New York, 1978.

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

BRASIL, D. S. B.; ALVES, C. N.; GUILHON, G. M. S. P.; MÜLLER, A. H.; SECCO, R. de S.; PERIS, G.; LIUSAR, R. Crystal structure and theoretical study of IR and ^1H and ^{13}C NMR spectra of cordatin, a natural product with antiulcerogenic activity. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 108, n. 13, p. 2564-2575, 2008.

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

CAMPOS, M. C. O; SALOMÃO, K; CASTRO PINTO, D.B.; LEON, L. L.; BARBOSA, H. S.; MACIEL, M. A. A.; *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**. p. 1193-1204. 2010.

CARVALHO, F.C; ARAÚJO FILHO, J.A.; GARCIA, R.; PEREIRA FILHO, J.M.; ALBUQUERQUE, V.M. Efeito do corte da parte aérea na sobrevivência do marmeleiro (*Croton soderianus* Muell. Arg.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30, n.3, p.930- 934. 2001.

CARVALHO, S. I. C. **Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var. *vulgaris* cv. Bandeirante**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 72 p. 1993.

COLOMBO. **Introdução à fitoterapia**: utilizando adequadamente as plantas medicinais. Colombo: Herbarium Lab. Bot. Ltda.92p, 2008.

COSTA, C. M; FARIA. L. J. G. Otimização do processo de extração química de óleos vegetais utilizando metodologia de superfície de resposta. In: **Tópicos Especiais em Tecnologia de Produtos Naturais**. UFPA, NUMA, POEMA, p. 220. 1998.

COUTINHO, E.M.O. **Estudo fitoquímico e de atividade biológica de espécies de *Solanum*. (Solanaceae)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

CRAVEIRO A.A; SIVEIRA ER. Braz RF; Mascanheras IP, sounderianis, a furanoid from *croton sounderianus*; **Phytochemistry**, v.20, p. 852-854, 1981

CRAVEIRO A.A; SIVEIRA ER. Two cleistanthane type diterpenes from *croton sounderianus*; **Phytochemistry** 21. p. 2571-2574, 1982.

CUNHA, L.C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 403-411, 2009.

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

DAKSHINI, K. M. M.; FOY, C. L.; INDERJIT. Allelopathy: one component in a multifaceted approach to ecology. In: INDERJIT, DAKSHINI, K. M. N., FOY, C. L., eds. Principles and practices in plant ecology. CRC Press LLC, p. 3-14. 1999.

DAMASCENO, T. S; MONTEIRO, H. O.; **Estudo fitoquímico das cascas do caule de *croton palanostigma* klotzsch e avaliação antimicrobiana dos diterpenos clerodânicos aparisthmano e cordatina**, Trabalho de conclusão de curso (graduação em Química Industrial), Instituto Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

DUDAI, N.; MAYBER, A.P; MAYER, A.M; PUTIEVSKI, E.; LERNER, H. R. Essential oils as allelochemicals and their potential user as herbicides. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n.5, p 1079-1089, 1999.

GONZALEZ AG; FRAGA BM; HANSON JR; The ¹³ C NMR spectra of some ent-18-hidroxykaur-16-enes; **Phytochemistry** 20, 846-847, 1981.

GUENTHER, E. **The essential oils**, v. 1. New York: Fritzsche Brothers INC, 1955.

Farmacopéia brasileira, **Ministério da saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Parte I – Métodos gerais – IV edição. São Paulo. Atheu editora São Paulo, 1996.

HARRELL, C.; GHOSH, B. K.; BOWDEN, R. **Simulation using Promodel**. 3 ed. Boston: McGraw-Hil, 2000.

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

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

KATO-NOGUCHI, H.; INO, T. Assessment of allelopathic potential of root exudate of rice seedlings. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 44, n. 4, p. 635-638, 2001

KITAZAWA, E., SATO, A., TAKAHASHI, H., KUWANO, H., OGISO, A.; Novel diterpenelactones with anti-peptic ulcer activity from *Croton sublyratus*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. 28 (1): 227-234, 1980.

LEWIS, D. A., HANSON, P. J.; "Anti-Ulcer Drugs of Plant Origin". Ed. G. P. Ellis, G. B. West, **Progress in Medicinal Chemistry**, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1991, p. 201-231.

MACHADO, M.M. **Perfil fitoquímico e avaliação dos efeitos biológicos e imunológicos in vitro de Euphorbia tirucalli** L. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Santa Maria-RS, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA Jr., V. F.; MARTINS, J. R.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A.; LAPA, A. J.; VANDERLINDE, F. A.; *Phytochem. Pharmacol. II Ser. Recent Prog. Med. Plants*, v.8, p.460, 2002.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 5 ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. 2 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2003.

MÜLLER, A. H.; OSTER, C. B.; SHUCKMANN, W. K.; BARTL, H. Aparisthman, methyl 1-(3-furoylmethyl)-4a-hydroxy-1,2-dimethyl-2,3,4,4a,5,8,9,9a-octahydro1Hbenzocycloheptene-6-carboxylate, A seven-membered ring diterpenoid from *Aparisthium cordatum*. **Phytochemistry**, vol. 25, n. 6, p. 1415-1417, 1986.

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

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

NEWMAN, E.I. Mycorrhizal links between plants: Theirs functioning and ecological significance. **Advances in Ecological Research**, Londres, v. 18, 1988.

NOVAIS, T.S; COSTA, J. F.O. Atividade antibacteriana de alguns extratos vegetais do semiárido brasileiro. **Revista brasileira de Farmacognosia**. V.14, p. 5-8. 2003.

OMS - Organización Mundial de la Salud. Pautas para a evaluación de medicamentos herbarios. Genebra, 1991. Disponível em <http://www.who.int/es/> Acesso em 05/09/12.

PALMEIRA JUNIOR, S. F.; CONSERVA, L. M.; SILVEIRA, E. R. Two clerodane diterpenes and flavonoids from *Croton brasiliensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 16, n. 6B, p. 1420–1424, 2005.

PEIXOTO, R. N. S. et al. 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2009. Fortaleza - CE. (PN T0155-1).

POLLITO, P. A. Z. **Dendrologia, anatomia do lenho e “status” de conservação das espécies lenhosas dos gêneros *Cinchona*, *Croton* e *Uncaria* no estado do Acre, Brasil**. 2004. 181 f. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, 2004.

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

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, pág. 603-613. 2001.

RICE, E.L. Allelopathy effects on nitrogen cycling. In: RIZVI, S.J.H.; RIZVI, H.(Eds) **Allelopathy: basic and applied aspects**. London, 1992. p.31-58.

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

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

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

ROSA, M. S. S.; MENDONÇA FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES I. A.; SOARES, R. M. A.; ALVIANO, C. S; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 1895–1901, 2003.

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

SANDOVAL, M.; AYALA, S.; ORÉ, R.; ARROYO, J. **Inducción de la formación de muco gástrico por sangre de grado (*Croton palanostigma*)**. Anales de la Facultad de Medicina, vol. 63, n. 4, p. 251-256, 2002a.

SANDOVAL, M.; AYALA, S.; ORÉ, R.; LOLI, A.; HUAMÁN, O.; VALDIVIESO, R.; BÉJAR, E. Capacidad antioxidante de la sangre de grado (*Croton palanostigma*) sobre La mucosa gástrica, en animales de experimentación. Anales de la Facultad de Medicina, vol. 67, n. 3, p. 199-205, 2006.

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

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

SHELLACK, G. **Farmacologia: uma abordagem didática**. São Paulo: Editora Fundamento Educacional, 2005, 190 p.

SCOPEL, M. **Análise botânica, química e biológica entre flores das espécies *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis*. Cham. & Schlttdl. e avaliação preliminar da estabilidade**. 2005. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre.

SIMIONATTO, E. CANDIDO A. C. S (2009); Bioactivity and chemical composition of the essential oils the croton urucurana (Baillon) (Euphobiaceae). **Journal of the Essential of Oil-Bearing Plants**, v.12, p.250-261.

SIMÕES, C. M. O.; PETROVICK, VP.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 2ed. Rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2003.

SIMÕES, J. C.; SILVA, A. J. R.; SERRUYA, H.; BENTES, M. H. S. Desidrocrotonina, m norditerpeno de *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Ciência e Cultura**, vol. 31, p. 1140-1143, 1979.

SOCORRO, S. R. M.S; MENDONÇA FILHO, R. R.; BIZZO, H. R; ALMEIDA, R.I; SOARES, R. M.; ALVIANO C.S.; Antileishmanial activity of linanool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobs agents' chemother**. V.27, 895-901. 2003.

SOUZA BRITO, A. R. M.; RODRÍGUEZ J.A.; HIRUMA-LIMA, C.A.; HAUN, M.; NUNES D.S. Antiulcerogenic Activity of trans-dehydrocrotonin from Medicinal species. **Planta Medica**. 64: 136-129 1998.

SOUZA FILHO, A. S.P.S; ALVES, S. M.; MULLER, A.H.; SANTOS, L. S.; ARRUDA, M, S,P. **Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Emprapa, Amazônia oriental, 2002, p.. 111-148.

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

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2006. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. Instituto Plantarum, Nova Odessa.

THAPAR, R.; SINGH, N.B. Effects of leaf-residues of *Croton bonplandianum* on growth and metabolism of *Parthenium hysterophorus* L. **Allelopathy Journal, Allahabad**, v.18, n.2, p.255-266, 2006.

VILAS BOAS, G. K.; GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústrias de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para uma discussão de uma política nacional. **Cadernos de saúde pública**, v. 23, 2007.

WEBSTER, G. L. 1994. Systematics of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 81: 1 144.

APÊNDICE

MEMÓRIA DE CALCULO DAS VARIÂNCIAS EXPLICADA E REAL

A variância pode ser expressa como:

$$SQ_T = SQ_R + SQ_E$$

Onde SQ_T : representa a soma quadrática total;

SQ_R : soma quadrática dos resíduos;

SQ_E : soma quadrática dos erros;

Sendo que a SQ dos resíduos divide-se em soma quadrática devido ao erro puro (SQ_{ep}) e soma quadrática devida a falta de ajuste do modelo (SQ_{faj}), então:

$$SQ_T = SQ_{ep} + SQ_{faj} + SQ_E$$

Os coeficientes de determinação múltipla, R^2 representam a percentagem de variância de acordo com a equação de regressão:

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} = 1 - \frac{SQ_E}{SQ_T}$$

A variância explicável pode ser determinada a partir das parcelas relativas à regressão e à falta de ajuste:

$$R^2 = \frac{SQ_T - SQ_{EP}}{SQ_T} = 1 - \frac{SQ_{EP}}{SQ_T}$$

A partir da Tabela 06: análise de variância (ANOVA) para a resposta rendimento, pode se calcular as variâncias real e explicada.

Efeitos	SQ	GL	MQ	F	p
X_1	2,88156	1	2,88156	2,34562	0,265312
X_1^2	0,15015	1	0,15015	0,12222	0,760020
X_2	0,14459	1	0,14459	0,11770	0,764252
X_2^2	8,00483	1	8,00483	6,51600	0,125273
X_3	12,88543	1	12,88543	10,48885	0,083563
X_3^3	0,02382	1	0,02382	0,01939	0,902010
X_1X_2	4,20148	1	4,20148	3,42004	0,205646
X_1X_3	3,06460	1	3,06460	2,49461	0,255002
X_2X_3	0,21818	1	0,21818	0,17760	0,714415
Falta de ajuste	15,99054	3	5,33018	4,33881	0,192973
Erro puro	2,45698	2	1,22849		
Total	50,02637	14			

Sendo:

$$SQ_T = 50,02637$$

$$SQ_R = SQ_T - (SQ_{faj} + SQ_{EP}) = 50,02637 - (15,99054 + 2,45698) = 31,57885$$

$$R^2 = (31,57885 / 50,02637) \cdot 100 = 62,12\% \text{ (variância explicada)}$$

$$R^2 = [(50,02637 - 2,45698) / 50,02637] \cdot 100 = 95,09\% \text{ (variância real)}$$