



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB

FACULDADE DE CEILÂNDIA

CURSO DE FARMÁCIA

RENATA CARVALHO DE LIMA

**INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM ETANOL NA CINÉTICA DE
SECAGEM, TEOR DE CUMARINA E ESTRUTURA DAS FOLHAS DE GUACO**

(*Mikania glomerata* Sprengel/*Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker)

BRASÍLIA – DF

JUNHO – 2015

RENATA CARVALHO DE LIMA

**INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM ETANOL NA CINÉTICA DE
SECAGEM, TEOR DE CUMARINA E ESTRUTURA DAS FOLHAS DE GUACO
(*Mikania glomerata* Sprengel/*Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker)**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada à Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a MSc. Tamara Ângelo de Oliveira Santos Damasceno

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Paula Melo Martins

BRASÍLIA – DF

JUNHO, 2015

RENATA CARVALHO DE LIMA

**INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM ETANOL NA CINÉTICA DE
SECAGEM, TEOR DE CUMARINA E ESTRUTURA DAS FOLHAS DE GUACO
(*Mikania glomerata* Sprengel/*Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker)**

BANCA EXAMINADORA

**Prof.^a MSc. Tamara Ângelo de Oliveira Santos Damasceno
(Orientadora)
(FCE/Universidade de Brasília)**

**Prof.^a Dr.^a Paula Melo Martins (Co-orientadora)
(FCE/Universidade de Brasília)**

**Prof. Dr. Christopher William Fagg
(FCE/Universidade de Brasília)**

**Prof. MSc. Breno Noronha Matos
(FS/Universidade de Brasília)**

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante”.

Charlie Chaplin

Dedico este trabalho aos meus pais, Andrea e Evaldo, que em todos os momentos acreditaram no meu potencial, sempre me apoiaram e cujo amor que sinto é imensurável.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a MSc. Tamara Ângelo de Oliveira Santos Damasceno que mudou sua rotina para me orientar. Agradeço pela presença, paciência e pelos ensinamentos, fundamentais na execução deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Paula Melo Martins pela co-orientação, confiança, serenidade e por permitir que este estudo fosse realizado.

Aos Professores Guilherme Martins Gelfuso, Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho e Taís Gratieri do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos da Faculdade de Saúde/UnB por concordarem que os ensaios de secagem e cromatografia fossem executados.

À Prof.^a Dr.^a Maria Hosana pelo apoio imprescindível nas análises por CLAE.

Ao Prof. Dr. Juliano Chaker que, gentilmente, dispôs do seu tempo para auxiliar nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Às servidoras Ingrid e Shaiane do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (Campus Darcy Ribeiro) pela assistência nas análises de microscopia eletrônica de varredura e corte histológico.

A Deus pela vida e conquistas. “Obrigada meu Deus! Sei que mesmo nos momentos mais difíceis da minha vida o Senhor sempre estará presente”.

Aos meus Pais, Andrea Valentina e Evaldo José, pelo amor e dedicação.

Aos meus irmãos pelos inúmeros momentos de alegria e companhia.

À minha madrinha (segunda mãe) Nair pelo amor, carinho e cuidado.

Aos meus avós, tias e tios. Em especial, ao tio Arthur pelo aconselhamento e por acreditar no meu potencial.

Aos amigos Thompson, Gihad, Bruna e Raissa por todos os momentos de felicidade. Amo vocês!

Às amigas de graduação Veridiana, Gabriela, Lilian e Renata Eliza pela amizade, por compartilharem conhecimento, pelos momentos de alegria e risadas. Enfim, por tornarem essa etapa da minha vida mais agradável e feliz. Vocês moram no meu coração. Contem sempre comigo.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente, aproveito a ocasião para formalmente expressar meus sinceros e profundos agradecimentos.

RESUMO

LIMA, R. C. **Influência do pré-tratamento com etanol na cinética de secagem, teor de cumarina e estrutura das folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel/*Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker)**. Monografia (graduação), Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

As plantas da família Asteraceae vêm sendo estudadas em virtude da sua composição química, atividade farmacológica e uso popular. Tendo em vista a relevância das etapas de processamento de plantas medicinais na conservação das substâncias ativas e qualidade dos fitoterápicos, esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência do pré-tratamento com etanol na cinética de secagem, teor de cumarina e estrutura das folhas de guaco. A secagem foi direcionada por um planejamento fatorial de experimentos com duas variáveis e três níveis (3^2). O pré-tratamento consistiu na mergulhia das folhas de guaco em etanol (40, 70% e álcool etílico absoluto) por tempos distintos (5, 45 e 85 segundos) à temperatura ambiente. Os experimentos de secagem foram conduzidos em estufa, utilizando temperatura de 50⁰C. Os dados de secagem das folhas de guaco foram ajustados aos modelos matemáticos de Page, Page modificado e Henderson e Pabis. Para verificar a influência do pré-tratamento no teor de cumarina e na estrutura foliar do guaco, foi validado um método por cromatografia líquida de alta eficiência e realizada a análise de superfície por microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. O uso do pré-tratamento com etanol nas folhas de guaco aumentou a remoção do conteúdo de umidade durante a secagem e reduziu o tempo do processo. Além disso, o teor de cumarina obtido para o tratamento no ponto ótimo foi superior a todos os resultados prévios, sendo cerca de duas vezes maior em comparação ao controle.

Palavras-chave: guaco, secagem, etanol, cumarina.

ABSTRACT

LIMA, R. C. **Influence of pre-treatment with ethanol in the drying kinetics, coumarin content and structure of guaco leaves (*Mikania glomerata* Sprengel/*Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker).** Monograph (graduation), Ceilândia College, University of Brasília, Brasília, 2015.

The plants of Asteraceae family have been studied due to its chemical composition, pharmacological activity and medicinal use. Given the importance of medicinal plants processing steps in conservation of active substances and quality of herbal medicines, this study aimed to evaluate the effect of pretreatment with ethanol in drying kinetics, coumarin content and structure of guaco leaves. Drying was directed by a factorial design of experiments with two variables and three levels (3^2). The pretreatment consisted of layering leaves of guaco in ethanol (40, 70% and absolute ethyl alcohol) for different times (5, 45 and 85 seconds) at room temperature. The drying experiments were conducted in greenhouse dryer using 50°C temperature. The drying of guaco data leaves were adjusted to Page, Page and Henderson and modified Pabis mathematical models. To check the influence of the pretreatment on coumarin content and leaf structure of guaco, it was validated a method for liquid chromatography of high efficiency and performed the surface analysis by scanning electron microscopy. The use of pretreatment with ethanol in guaco leaves increased removal of the moisture content during drying and reducing the process time. Furthermore, the coumarin content obtained for the optimum treatment was superior to all previous results, about two times higher compared to the control.

Keywords: guaco, drying, ethanol, coumarin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** A. Guaco cultivado no Horto de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares da Faculdade de Ceilândia/UnB; B. Folha de guaco...22
- Figura 2:** Biossíntese de cumarina adaptado de Czelusniak *et al.* (2012).....25
- Figura 3:** Curvas típicas de secagem adaptado de Marchese e Figueira (2005). A curva de secagem está representada graficamente pela curva (a), a taxa de secagem pela curva (b) e a curva da evolução da temperatura do produto durante a secagem pela curva (c)..29
- Figura 4:** Guaco cultivado no Horto de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares da Faculdade de Ceilândia/UnB.....43
- Figura 5:** Mergulhia das folhas de guaco em etanol.....45
- Figura 6:** Curva de secagem do controle e das folhas de guaco tratadas com etanol 40% em tempos distintos de mergulhia (5,45 e 85 s).56
- Figura 7:** Curva de secagem do controle e das folhas de guaco tratadas com etanol 70% em tempos distintos de mergulhia (5,45 e 85 s).57
- Figura 8:** Curva de secagem do controle e das folhas de guaco tratadas com álcool etílico absoluto em tempos distintos de mergulhia (5,45 e 85 s).57
- Figura 9:** Curva de secagem do controle e das folhas de guaco tratadas com etanol em concentrações distintas (40, 70 e 100%), avaliando o tempo de mergulhia de 5 s.58
- Figura 10:** Curva de secagem do controle e das folhas de guaco tratadas com etanol em concentrações distintas (40, 70 e 100%), avaliando o tempo de mergulhia de 45 s.58
- Figura 11:** Curva de secagem do controle e das folhas de guaco tratadas com etanol em concentrações distintas (40, 70 e 100%), avaliando o tempo de mergulhia de 85 s.59
- Figura 12:** MEV. Superfície abaxial (A) e adaxial (B) das folhas de guaco retirada ao término da secagem. Secagem do controle (1A-B). Escala: (500 μ m), 100 X.....60
- Figura 13:** MEV. Superfície abaxial (A) e adaxial (B) das folhas de guaco retirada ao término da secagem. Tratamento com etanol 40% e mergulhia de 5

- segundos (2 A-B); Tratamento com etanol 40% e mergulhia de 45 segundos (3 A-B); Tratamento com etanol 40 % e mergulhia de 85 segundos (4 A-B). Escalas: 500 μm , 100 X.....61
- Figura 14:** MEV. Superfície abaxial (A) e adaxial (B) das folhas de guaco retirada ao término da secagem. Tratamento com etanol 70% e mergulhia de 5 segundos (5 A-B); Tratamento com etanol 70% e mergulhia de 45 segundos (6 A-B); Tratamento com etanol 70% e mergulhia de 85 segundos (7 A-B). Escalas: 500 μm , 100 X.....62
- Figura 15:** MEV. Superfície abaxial (A) e adaxial (B) das folhas de guaco retirada ao término da secagem. Tratamento com etanol 100% e mergulhia de 5 segundos (8 A-B); Tratamento com etanol 100% e mergulhia de 45 segundos (9 A-B); Tratamento com etanol 100% e mergulhia de 85 segundos (10 A-B). Escalas: 500 μm , 100 X.....63
- Figura 16:** Tricoma glandular na superfície abaxial da folha de guaco seca que passou por tratamento em etanol 40% e mergulhia de 45 segundo. Escalas: 10 μm66
- Figura 17:** Secções transversais das folhas de guaco. Folha fresca (A-C); Folha desidratada (D-E). Epiderme (ep); Parênquima paliçádico (pp); Parênquima lacunoso (pl); Folha fresca sem tratamento (A), Escala: 50 μm , 20 X; Parênquima paliçádico da folha fresca sem tratamento (B), Escala: 10 μm , 40 X; Parênquima lacunoso da folha fresca sem tratamento (C), Escala: 10 μm , 40 X; Folha desidratada que não passou pelo tratamento com etanol (D), Escala: 20 μm , 20 X; Folha desidratada que passou por tratamento com etanol absoluto e mergulhia de 45 segundos (E), Escala: 50 μm , 20 X.67
- Figura 18:** Cromatogramas do pico de cumarina de uma solução do padrão (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (A) e da amostra (B) obtidos empregando-se CLAE. Condições cromatográficas: volume de injeção de 20 μL , vazão de 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, eluição isocrática metanol:água MiliQ (60:40) v/v, UV - 274 nm, temperatura do forno de 30 $^{\circ}\text{C}$ e coluna C18 de fase reversa: 150 mm x 4,6 mm, 5 μm69
- Figura 19:** Curva de calibração construída com padrão cumarina para avaliar a linearidade do método.70

Figura 20: Teor de cumarina das folhas de guaco secas, utilizando diferentes tratamentos de secagem.	73
Figura 21: Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis no teor de cumarina. ..	74
Figura 22: Gráfico de superfície de resposta para as condições estudadas e seus efeitos no teor de cumarina.	75
Figura 23: Gráfico da curva de contorno para as condições estudadas e seus efeitos na resposta (teor de cumarina).	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Modelos matemáticos de secagem utilizados para predizer o fenômeno de secagem.....	31
Tabela 2: Elementos requeridos pela ICH para validação de ensaios.....	34
Tabela 3: Variáveis do planejamento fatorial 3^2 e seus níveis.....	44
Tabela 4: Matriz do planejamento fatorial 3^2	44
Tabela 5: Parâmetros obtidos para o ajuste do modelo matemático de secagem das folhas de guaco e valores do coeficiente de determinação (R^2), qui-quadrado (χ^2) e raiz do quadrado médio residual (RMSE).....	53
Tabela 6: Dados da quantificação da cumarina dos extratos metanólicos das folhas de guaco nos diferentes experimentos.	72

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABIFISA	Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatográfica Líquida de alta eficiência
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EtOH	Etanol
GLR	Grau de liberdade do modelo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ICH	Conferência Internacional sobre Harmonização
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.
<i>M. glomerata</i>	<i>Mikania glomerata</i> Sprengel
<i>M. laevigata</i>	<i>Mikania laevigata</i> Sch. Bip. ex Baker
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAL	Fenilalanina-amônio-liase
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RE	Resolução
RNA	Ácido ribonucleico
SUS	Sistema Único de Saúde
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
%	Por cento
°C	Graus Celsius
a.C	Antes de Cristo
b.s.	Base seca
b.u	Base úmida
cm	Centímetro
CV %	Coeficiente de variação
dX/dt	Taxa de secagem ao longo do tempo

g	Gramma
k	Constante de secagem
kg	Quilograma
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
n	Coefficiente do modelo
n°	Número
R²	Coefficiente de determinação/coefficiente de correlação linear
RMSE	Raiz do quadrado médio residual
RU	Razão de umidade
s	Segundos
t	Tempo
UV	Ultravioleta
X	Conteúdo de umidade do produto
χ^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Fitoterapia	20
1.2. Família Asteraceae	21
1.3. Gênero <i>Mikania</i>	21
1.3.1. Atividade farmacológica.....	23
1.3.2. Constituintes químicos.....	23
1.4. Cumarina.....	24
1.4.1. Biossíntese de cumarina	24
1.5. Secagem de plantas medicinais e aromáticas	26
1.6. Cinética de secagem.....	28
1.7. Ajuste do modelo de secagem	30
1.8. Uso do etanol previamente à secagem	32
1.9. Microscopia	33
1.10. Cromatográfica líquida de alta eficiência	33
1.11. Validação de método analítico	33
1.11.1. Especificidade/Seletividade	35
1.11.2. Linearidade	36
1.11.3. Intervalo.....	36
1.11.4. Limite de detecção.....	37
1.11.5. Limite de quantificação	38
1.11.6. Precisão.....	38
1.11.7. Exatidão.....	39
1.11.8. Robustez	40
2. JUSTIFICATIVA.....	41
3. OBJETIVOS.....	42
3.1. Objetivo Geral	42
3.2. Objetivos Específicos	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. Material	43
4.1.1. Padrão e solventes.....	43

4.1.2. Matéria prima.....	43
4.2. Método	44
4.2.1. Planejamento fatorial de experimentos.....	44
4.2.2. Pré-tratamento das folhas de guaco com etanol.....	45
4.2.3. Secagem das folhas de guaco.....	46
4.2.4. Determinação do teor de umidade por dessecação em balança de infravermelho	47
4.2.5. Microscopia eletrônica de varredura.....	48
4.2.6. Corte histológico	48
4.2.7. Preparo dos extratos das folhas de guaco	49
4.2.8. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência	49
4.2.9. Validação do método cromatográfico	50
4.2.9.1. Especificidade/Seletividade.....	50
4.2.9.2. Linearidade e intervalo	50
4.2.9.3. Limites de detecção e quantificação	51
4.2.9.4. Precisão	51
4.2.9.5. Exatidão	52
4.3. Análise estatística	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1. Modelagem matemática	53
5.2. Cinética de secagem.....	55
5.3. Influência do uso do etanol e da secagem na estrutura foliar do guaco ..	60
5.4. Validação do método cromatográfico.....	68
5.4.1. Especificidade/Seletividade	68
5.4.2. Linearidade.....	69
5.4.3. Limite de detecção e Limite de quantificação	70
5.4.4. Precisão.....	71
5.4.5. Exatidão.....	71
5.5. Planejamento fatorial e doseamento.....	71
6. CONCLUSÃO	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal pode ser definida como a planta, cultivada ou não, utilizada para fins medicinais (WHO, 2007).

O seu uso pela humanidade é milenar, sendo um dos primeiros recursos empregados no mundo para prevenção, tratamento e cura de enfermidades (ROCHA *et al.*, 2015). Há relatos de documentos sumérios e babilônicos, alguns com mais de 3.000 anos, escritos em placas de barros com caracteres cuneiformes, que descrevem o uso do gálbano, assafétida, meimendo, ópio (referido em ideograma como "planta da alegria") dentre outros produtos vegetais (RIBEIRO, 2012). Outro achado importante é o Papiro Ebers, decifrado em 1873 pelo egiptólogo alemão Georg Ebers, que data cerca de 1.500 anos a.C. Esse documento abrange informações de mais de 7.000 substâncias medicinais em aproximadamente 800 fórmulas (MENEZES, 2005). Na China há notícias de que os médicos chineses, por volta do ano 2.800 a.C., contavam com um elenco de plantas e suas indicações terapêuticas, sendo o Pen Tsao de Shen Nung a primeira referência de documentação escrita (ELDIN; DUNFORD, 2001).

Até meados do século XIX, a base da terapêutica medicamentosa era constituída, principalmente, por produtos naturais. Em 1803, o farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner isolou a morfina da *Papaver somniferum*, um marco no processo de extração de princípios ativos de plantas. A partir disso, outras substâncias foram isoladas, como por exemplo, a quinina e a quinidina obtidas da *Cinchona spp*, em 1819, e a atropina da *Atropa belladonna*, em 1831 (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

O cenário de utilização de ervas é modificado no século XX com a expansão progressiva do setor industrial após a Segunda Guerra Mundial e desenvolvimento da química orgânica e da medicina alopática, resultando em substituição ascendente do uso de extratos de plantas por fármacos sintéticos (RATES, 2001). A atenção para o desenvolvimento de novos fármacos empregando plantas é retomado em 1980, com o aprimoramento dos métodos de isolamento de substâncias ativas a partir de fontes naturais e identificação de

substâncias em amostras complexas como os extratos vegetais (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

No Brasil, o conhecimento quanto ao uso de plantas teve grande influência dos índios (pajés) com seu amplo saber sobre a utilização de ervas locais, dos escravos africanos com o uso de plantas em rituais religiosos e tratamento de doenças e dos europeus que passaram a viver no Brasil ao assimilar os conhecimentos locais e os integrar com os que haviam trazidos da Europa (LORENZI; MATOS, 2002).

Para alguns grupos étnicos e comunidades de regiões mais pobres, as plantas ainda representam o principal recurso terapêutico disponível. Nas cidades brasileiras, a comercialização de plantas medicinais em feiras e mercados municipais é um ato comum, sendo crescente o interesse da população por esses produtos (SANTOS, *et al.*, 2011). Pesquisas demonstram que 91,9% da população fizeram uso de alguma planta medicinal no Brasil, sendo que 46% da mesma mantem cultivo caseiro dessas plantas (ABIFISA, 2007; ETHUR *et al.*, 2011).

O conhecimento tradicional a cerca do uso de plantas vem auxiliando na descoberta de espécies vegetais com potencial terapêutico e métodos de pesquisa no desenvolvimento de novos fármacos. Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados, diretamente ou indiretamente, de plantas medicinais principalmente por meio da aplicação de tecnologias modernas ao conhecimento tradicional (BRASIL, 2012).

Nota-se uma crescente revalorização, nas últimas décadas, do emprego de medicamentos, cosméticos e suplementos alimentares à base de produtos naturais (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). De acordo com Alves (2013), o mercado global de medicamentos (sintéticos e naturais) foi estimado em 800 bilhões de dólares, enquanto o mercado para os fitoterápicos atingiu o patamar de 26 bilhões de dólares em 2011. No Brasil, o setor de medicamentos fitoterápicos representa 3% do mercado farmacêutico total, com faturamento na ordem de 1 bilhão de dólares (SOUZA; BORGES, 2014). Esse setor vem exercendo um papel expressivo no desenvolvimento econômico de vários países e representa um mercado farmacêutico bastante promissor, sendo as pesquisas nessa área e

diversas linhas do conhecimento de grande relevância na identificação de espécies com potencial terapêutico e descoberta de fármacos (KUSTER, 2013).

1.1. Fitoterapia

Segundo a RDC nº 14/2010, fitoterápico pode ser definido como “medicamento obtido com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não podem ser incluídos no medicamento fitoterápico substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais” (BRASIL, 2010).

O uso de plantas medicinais e fitoterápicos como prática alternativa de saúde vem sendo estimulada pela própria OMS desde 1978. A criação do “Programa de Medicina Tradicional”, na década de 70, incentivou os estados membros a implementarem políticas públicas com o propósito de auxiliar a integração da medicina tradicional e medicina complementar alternativa nos sistemas nacionais de atenção à saúde, bem como, promover o seu uso racional (BRASIL, 2012).

Em 2006, o Ministério da Saúde publicou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Esta política tem como objetivo, garantir à população o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, além de promover o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006).

De acordo com Macedo e Gemal (2009), é nesse contexto que o desenvolvimento de fitomedicamentos se mostra como um segmento importante de mercado a nível nacional e internacional, representando para o complexo industrial da saúde do Brasil uma oportunidade de consolidar o potencial tecnológico e industrial dessa categoria de medicamentos.

Com o aumento no consumo desses produtos, é imprescindível garantir a qualidade dos mesmos. A má qualidade da droga vegetal pode comprometer a

eficácia do produto fitoterápico e oferecer riscos à saúde do consumidor. Deste modo, para atender os padrões impostos pelo mercado internacional, a qualidade deve ser garantida durante toda a cadeia de produtiva do fitoterápico, contemplando as etapas de cultivo, coleta, processamento, armazenamento, extração e elaboração do produto final (KLEIN *et al.*, 2009)

1.2. Família Asteraceae

Asteraceae é uma das maiores famílias de plantas e compreende cerca de 1.600 gêneros e 23.000 espécies (ROQUE, 2008). No Brasil, essa família é representada por, aproximadamente, 180 gêneros e 1.900 espécies (CONTIN, 2009). Tendo em vista a sua capacidade de adaptação ambiental, as plantas pertencentes a essa família podem ser encontradas nos mais diversos habitats e em condições climáticas variadas, desde regiões tropicais, subtropicais e temperadas montanhosas, sendo mais abundantes nas regiões abertas e áridas do que nas florestas tropicais úmidas (MARTINS *et al.*, 2006). Fatores como a capacidade de dispersão devido à presença de sementes com pápus plumosos, apêndices, estruturas de aderência e metabólitos secundários parecem ser determinantes para seu sucesso biológico (VENABLE; LEVIN, 1983).

Em relação à caracterização química, as plantas da família Asteraceae exibem grande diversidade de metabólitos secundários como poliacetilenos, diterpenóides, lactonas sesquiterpênicas, alcalóides e flavonoides. Dentre os terpenóides, destacam-se as lactonas sesquiterpênicas que são importantes marcadores quimiotaxonomicos para as espécies dessa família (OLIVEIRA, 2007).

Do ponto de vista econômico, são utilizadas para fins nutricionais, tecnológico, ornamentais, farmacêutico, apicultura e também em forragem para a produção pecuária (VITTO; PETENATTI, 2009).

1.3. Gênero *Mikania*

A família Asteraceae é classificada em subfamília e, por sua vez, em tribos. A tribo Eupatorieae dispõe de cerca de 170 a 180 gêneros e 2.400 espécies (HATTORI *et al.*, 2013). O gênero *Mikania*, pertencente à família Asteraceae e à tribo Eupatorieae, contém em torno de 430 espécies distribuídas, predominantemente, em regiões tropicais e subtropicais da América. No Brasil, com 171 espécies, sua principal área de dispersão se encontra nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (KING; ROBINSON, 1987). Dentre as principais espécies medicinais do gênero *Mikania*, encontram-se a *Mikania glomerata* Sprengel e a *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker, conhecidas popularmente como guaco (GASPARETTO *et al.*, 2010). O guaco é uma planta medicinal nativa do sul do Brasil, entretanto, vem sendo cultivada em outros estados (Figura 1) (BRASIL, 2012).

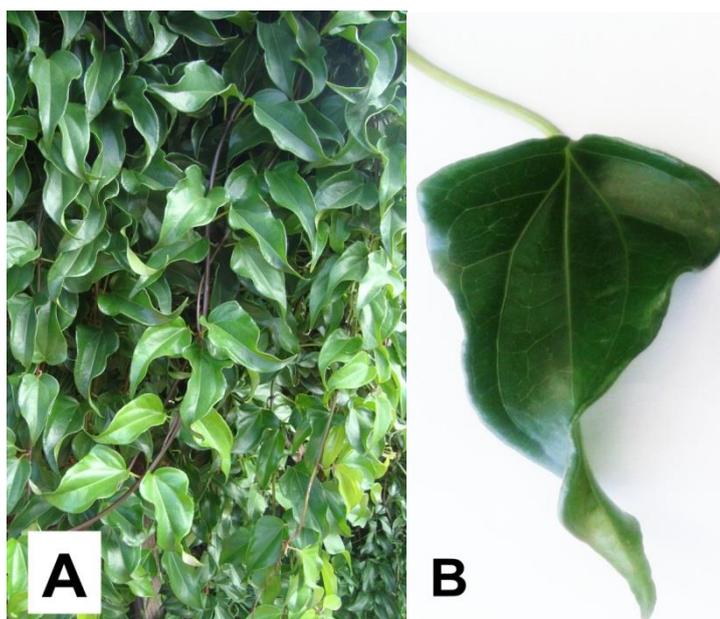


Figura 1. A. Guaco cultivado no Horto de Plantas Medicinai, Aromáticas e Condimentares da Faculdade de Ceilândia/UnB; B. Folha de guaco.

As espécies do gênero *Mikania* são herbáceas ou arbustivas, frequentemente volúveis. As folhas são de diferentes tipos, inteiras ou partidas, geralmente largas, opostas e pecioladas, as inflorescências são variadas (carimbosas, tirsóides), os capítulos florais constituídos por 4 flores isomorfas, apresentando corola tubulosa de coloração branca ou rosada (SILVA, 2011).

1.3.1. Atividade farmacológica

A ação farmacológica de extratos ou de substâncias isoladas de *Mikania* tem sido investigada para diversas espécies (BUDEL *et al.*, 2009). A *M. glomerata*, espécie mais estudada, é usada popularmente para tratar bronquite, tosse e asma. Também pode ser indicada para inflamações da garganta, utilizando-se as folhas para gargarejo (GASPARETTO *et al.*, 2010). Além de sua ação broncodilatadora (SOARES *et al.*, 2002), existem na literatura estudos relatando as propriedades antiofídica (MAIORANO *et al.*, 2005), antialérgica (FIERRO *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2006), ansiolítica (BRITO, 2012), antimicrobiana e anti-helmíntica (SANTANA, *et al.*, 2013) e antifúngica (PEREIRA *et al.*, 2014) da espécie. Estudos também mostrando a ação anti-inflamatória da *Mikania lindleyana* (SILVA, 2011), anti-ulcerogênica de *M. cordata* (PAUL; JABBAR; RASHID, 2000) e *M. laevigata* (BIGHETTI *et al.*, 2005).

Oficializada na Farmacopeia Brasileira primeira edição, a *M. glomerata* vem sendo utilizada no Sistema Único de Saúde (SUS) em várias apresentações (cápsula, solução oral, tintura e xarope) para tratar patologias relacionadas ao sistema respiratório. A inserção dessa espécie no elenco de Referência de Medicamentos e Insumos Complementares se deu em 2007, conforme anexo II da Portaria nº. 3.237 de 24 de dezembro de 2007. Financiados com recursos da União, estados e municípios, os medicamentos podem ser manipulados ou industrializados, e devem possuir registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2007). Já a *M. laevigata* teve sua monografia incluída em 2005 (BRASIL, 2005).

1.3.2. Constituintes químicos

Vários compostos têm sido identificados em *Mikania* tais como cumarinas, terpenóides, flavonóides, estigmasterol e um grande número de glicósidos. Dentre os constituintes químicos presentes no gênero, tem-se observado que os diterpenóides são os principais constituintes de espécies como a *M. congesta*, *M. lindbergii*, *M. hirsutíssima* entre outras. As lactonas sesquiterpênicas são componentes comumente encontrados na *M. micranta* (YUNES; CALIXTO,

2001;SILVA, 2011) e a cumarina simples (1,2-benzopirona) é encontrada em grande concentração nas folhas de *M. glomerata* e *M. laevigata* (CASTRO, 2002).

1.4. Cumarina

A cumarina simples (1,2-benzopirona) é considerada o marcador químico da *M. glomerata* e *M. laevigata* por ser encontrada em grande quantidade no vegetal, principalmente nas folhas, parte mais utilizada nas preparações contendo guaco (GASPARETTO *et al.*, 2010).

Cerca de 1.300 cumarinas já foram identificadas em fontes naturais como vegetais e fungos (CZELUSNIAK *et al.*, 2012). Dentre as propriedades farmacológicas das cumarinas estudadas, destacam-se a ação antimicrobiana (TADA *et al.*, 2002), anti-inflamatória (CHENG *et al.*, 2004) antitumoral (LEWIS *et al.*, 2004) e antioxidante (THUONG *et al.*, 2005). A ação anti-HIV de algumas cumarinas a partir de fontes vegetais também foram identificadas, como é o caso dos calanolídeos A e B, isolados das folhas da *Calophyllum lanigenum* Miq. var. *austrocoriaceum*, família Guttiferae, encontrada na Malásia. Essas substâncias interferiram na replicação *in vitro* do HIV-1, provavelmente, por inibição da atividade enzimática da DNA-polimerase dependente de DNA e da DNA-polimerase dependente de RNA presentes no vírus (SOUZA, 2014).

Quanto à aplicação das cumarinas pela indústria farmacêutica, esse constituinte químico já vem sendo utilizado para a produção de medicamentos com ação anticoagulante, anti-inflamatória, expectorante e broncodilatadora. Na indústria cosmética e de produtos de limpeza é empregada em lavandas, perfumes, aditivos de tintas e borrachas para mascarar o odor e como estabilizador de sabor e/ou odor de tabacos (SANTOS, 2013).

1.4.1. Biossíntese de cumarina

Estruturalmente as cumarinas, também denominadas benzopironas, são lactonas do ácido o-hidroxicinâmico (2H-1-benzopiran-2-ona), sendo o representante mais simples a cumarina (1,2-benzopirona). As cumarinas ocorrem

como cumarinas-simples, furanocumarinas, piranocumarinas, lignocumarinas, cumarinas dimericas e trimericas (MARTINS *et al.*, 2003).

A síntese dos metabólitos secundários de plantas deriva, principalmente, do metabolismo da glicose por duas vias principais: ácido chiquímico e acetato (LUCETTI, 2010). A via do ácido chiquímico produz três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, triptofano e tirosina, que contribuem na biossíntese de numerosos produtos naturais aromáticos em plantas superiores dentre eles os alcaloides, taninos, lignanas, ligninas e cumarinas (SCHMID; AMRHEIN, 1995).

A formação das cumarinas se dá pela condensação de dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato. A junção do ácido chiquímico com uma molécula de fosfoenolpiruvato dá origem ao ácido corísmico, ou corismato, precursor da fenilalanina. A fenilalanina é um aminoácido que por ação da fenilalanina-amônio-liase (PAL) forma o ácido cinâmico. O ácido cinâmico dá origem ao ácido o-cumárico após hidroxilação orto da cadeia lateral via ação enzimática da trans-cinamato-4-hidroxilase. Em seguida, o ácido o-cumárico sofre glicosilação e isomerização cis/trans, etapa imprescindível para que ocorra a lactonização e formação final da cumarina. A biossíntese de cumarina está indicada na Figura 2.

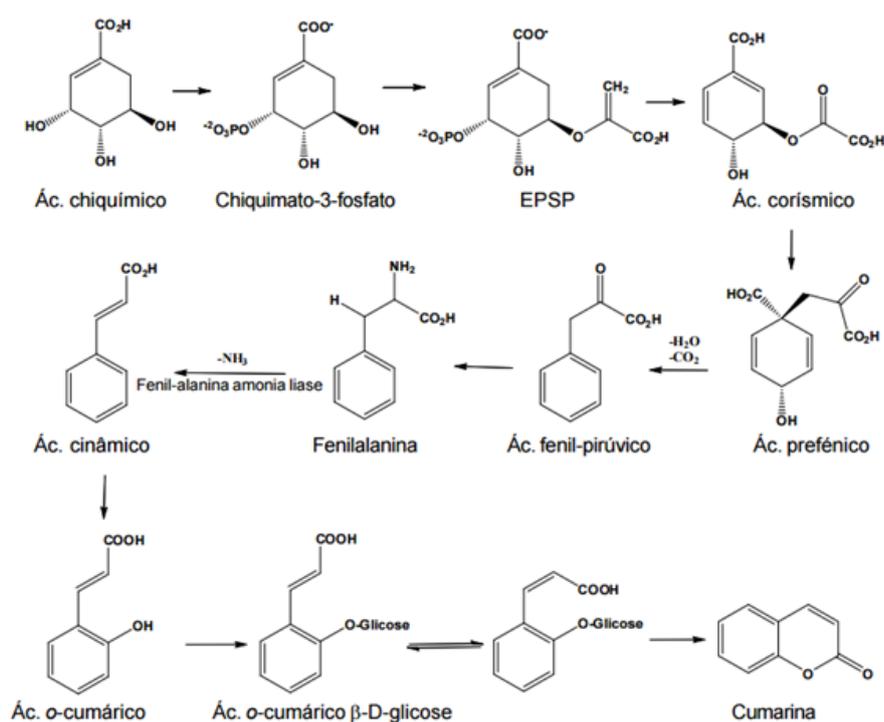


Figura 2: Biossíntese de cumarina adaptado de Czelusniak *et al.* (2012).

Outras substâncias também são formadas após ação enzimática da PAL como as ligninas, os flavonoides e o ácido benzoico, precursor do ácido salicílico, importante na defesa das plantas contra patógenos (CZELUSNIAK *et al.*, 2012).

O teor de cumarina da droga vegetal está relacionado com as condições ambientais de cultivo, processo de secagem e armazenamento. Caso uma dessas etapas não seja conduzida de forma apropriada, a qualidade das preparações farmacêuticas pode vir a ficar comprometida (SANTOS, 2013).

1.5. Secagem de plantas medicinais e aromáticas

Dentre os procedimentos pós-colheita mais antigos utilizados na preservação de alimentos e plantas, encontra-se a secagem. Esse método reduz o teor de umidade dos tecidos da planta e, conseqüentemente, diminui o processo de degradação promovido pela ação de fungos, bactérias e enzimas que podem interferir negativamente no teor de princípio ativo (SILVA, 2014a).

Além da conservação, outras vantagens são atribuídas a esse processo, dentre elas podemos citar a estabilidade dos componentes por tempo prolongado, redução do peso do produto e custos industriais com embalagens, transporte e armazenamento, além de economia de energia por não necessário refrigerar a planta (PARK; YADO; BROD, 2001).

O processo de secagem pode ser definido de diversas maneiras. Levando em consideração que os mecanismos de transferência de calor e massa são muito evidenciados nos estudos teóricos de secagem, a mesma pode ser definida como o processo no qual ocorre transferência simultânea de energia e massa entre o produto e o meio utilizado para secá-lo, que geralmente é o ar. Outras vezes, contudo, a secagem pode ser descrita como a operação unitária que leva à redução do teor de água do produto até que seja alcançado um nível seguro para o seu armazenamento (Dalpasquale (1984) apud Carlesso (2009)).

Dois fenômenos ocorrem simultaneamente no processo de secagem e são descritos por (PARK *et al.*, 2014). O primeiro está relacionado à transferência de energia (calor) para a superfície e da superfície para o interior do sólido, sendo essa transferência dependente das condições externas de temperatura, umidade e fluxo do ar e pressão. O segundo corresponde à transferência de massa

(umidade) do interior até a superfície e remoção do vapor para o meio, que geralmente é o ar. É na superfície do material que ocorre a evaporação da água, a qual foi transportada do interior do sólido. Nota-se com isso que o conhecimento do teor de umidade inicial e final (equilíbrio), a distribuição da água nos tecidos e seu transporte do interior do produto até a superfície possibilitam fundamentar o fenômeno da secagem (SILVA, 2012).

Em relação ao conteúdo de água na planta, esse pode ser classificado, segundo Hornok (1992) apud Parckert (2009) em: água ligada quimicamente, água ligada físico-quimicamente e água ligada mecanicamente. A água ligada quimicamente possui uma alta energia de ligação com as macromoléculas (proteínas, carboidratos) mantendo a sua integridade estrutural e não é removida pela secagem. Já a água ligada físico-quimicamente ocupa poros e capilares, não interage diretamente com a superfície das macromoléculas e pode ser retirada parcialmente. Por fim, a água ligada mecanicamente, a qual apresenta propriedade similar à solução diluída, encontrada na superfície e nos macrocapilares e pode ser removida mais facilmente.

Durante o processo de secagem, algumas mudanças físicas e químicas importantes ocorrem no produto gerando alterações na coloração, odor, textura, na capacidade de reidratação e formação de fissuras internas ou superficiais o que torna o produto mais suscetível à quebra (EIRAS, 2013).

De acordo com Cavariani, (1996) apud Eiras, (2013) a causa primária dos danos gerados por altas temperaturas em tecidos vegetais é a desintegração das membranas celulares, possivelmente, por alterações nos lipídios que as constituem. Os danos também podem ter reflexos a nível cromossômico e mitocondrial com redução do número de grãos de amido no eixo embrionário, aumento de lixiviação de eletrólitos e açúcares, redução de permeabilidade de membranas celulares e taxa respiratória.

Cada material biológico possui características próprias e, com isso, comportamentos e alterações estruturais distintas durante a secagem. Por esse motivo o fenômeno da secagem para materiais biológicos não pode ser generalizado (PARK *et al.*, 2014). No caso das folhas de guaco, algumas características do material interferem no processo de remoção da água dos tecidos e no tempo de secagem como, por exemplo, o tamanho e espessura das

folhas, presença de cutícula delgada, nervura central grossa e estrutura celular (RADÜNZ, 2004). Assim, a escolha do método de secagem, as variáveis envolvidas (temperatura do ar, umidade relativa, velocidade do ar e velocidade de difusão da água no produto), a duração do processo, as características da planta e sensibilidade dos compostos químicos devem ser levadas em consideração a fim de preservar suas características físicas e farmacológicas, atribuindo-lhe alto valor comercial (ATHIÉ *et al.*, 1998).

1.6. Cinética de secagem

O processo de secagem, alicerçado na transferência de calor e de massa, pode ser observado por meio de curvas de secagem. De modo geral, a curva de secagem corresponde à diminuição do teor de água do produto durante o processo. Cada sólido possui uma curva característica (PARK *et al.*, 2007). As curvas típicas de secagem estão ilustradas na Figura 3. A curva (a) é obtida ao traçar um gráfico do conteúdo de umidade do produto em base seca (X) ao longo do tempo de secagem. É possível notar quatro regiões distintas enumeradas em 0, 1, 2 e 3 que serão descritas a seguir neste trabalho. A curva (b) corresponde à curva de taxa de secagem a qual pode ser descrita como à velocidade da migração da umidade do interior do produto até a superfície. Essa migração está diretamente relacionada ao estado físico das moléculas de água (na forma líquida ou vapor) e ao mecanismo de transferência de massa (DIAS, 2013). E a curva (c) que equivale à curva da evolução da temperatura do produto durante a secagem e pode ser obtida medindo a temperatura do produto durante a secagem.

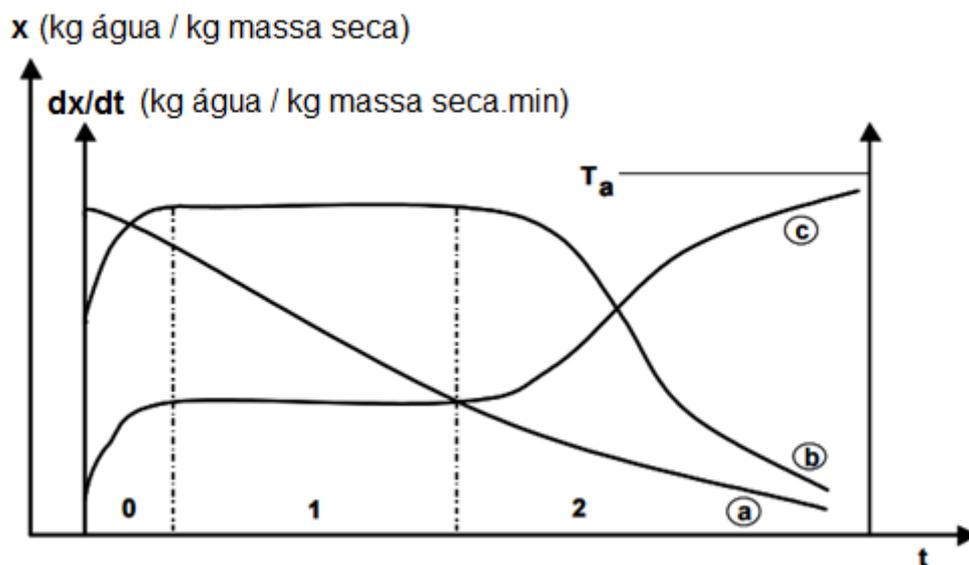


Figura 3: Curvas típicas de secagem adaptado de Marchese e Figueira (2005). A curva de secagem está representada graficamente pela curva (a), a taxa de secagem pela curva (b) e a curva da evolução da temperatura do produto durante a secagem pela curva (c).

O decurso das transferências simultâneas de calor e de massa no decorrer da operação de secagem pode ser esquematizado nos períodos descritos a seguir:

Região 0: refere-se ao período de ajuste do material às condições de secagem, no qual sua temperatura varia para atingir o estado estacionário. (AGUIRRE; GASPARINO FILHO, 2002). Em outras palavras, no início do processo, a temperatura do produto é inferior à do ar de secagem e a pressão parcial de vapor de água na superfície do produto é baixa, conseqüentemente, a transferência de massa e a taxa de secagem também são. A temperatura aumenta conforme o ar entra em contato com o produto, ocorrendo uma elevação na pressão de vapor de água e na velocidade de secagem. Esse processo perdura até a transferência de calor compensar a transferência de massa.

Região 1: corresponde ao período de velocidade constante, que é caracterizado pela estabilização da temperatura do sólido. A fase de taxa constante pode ser observada na secagem de produtos biológicos com umidade inicial bastante elevada (MÖHLER, 2010). Nessa etapa há um filme contínuo de

água sobre o sólido, pois a superfície exposta do material está saturada. O movimento de água do interior ocorre com velocidade suficiente para manter as condições de saturação na superfície, uma vez que a quantidade de água disponível no interior do sólido é grande. Enquanto houver quantidade de água na superfície do produto para acompanhar a evaporação, a taxa de secagem será constante. No caso de sólidos ou materiais não porosos, a água removida neste período é basicamente a água superficial. Por outro lado, para materiais porosos, o período de velocidade constante tende a continuar durante um tempo maior, já que a água removida da superfície é substituída pela água do interior do sólido (AGUIRRE; GASPARINO FILHO, 2002; PARK *et al.*, 2014).

A linha divisória entre as regiões 1 e 2 delimita o fim do período de velocidade constante de secagem e aponta para a umidade crítica. Neste ponto, o movimento do líquido do interior para a superfície do sólido é insuficiente para compensar o líquido que está sendo evaporado (PEREDA-ORDOÑEZ *et al.*, 2005).

Região 2: corresponde a taxa de secagem decrescente a qual a transferência de massa é reduzida, uma vez que a migração de umidade do interior para a superfície do produto é lenta e, conseqüentemente, as regiões saturadas se tornam menores. A interrupção da secagem ocorre quando se atinge a umidade de equilíbrio e a velocidade de secagem cai à zero (AGUIRRE; GASPARINO FILHO, 2002).

1.7. Ajuste do modelo de secagem

Os modelos matemáticos de secagem são utilizados com a finalidade de correlacionar os dados experimentais de secagem de um determinado material e descrever a taxa de perda de água durante o processo. Assim, o estudo dos modelos matemáticos permite realizar o dimensionamento de secadores, previsão da taxa de secagem, melhoria das condições de secagem e avaliação das variáveis envolvidas e qualidade do processo (NASCIMENTO; BIAGI; OLIVEIRA, 2015).

Esses modelos podem ser divididos em modelo empírico e semi-empírico, modelos difusivos e modelos baseados na termodinâmica dos processos irreversíveis (SILVA, 2010).

Os modelos empíricos apresentam uma relação direta entre o teor de umidade e o tempo do processo de secagem, enquanto que os modelos semi-empíricos tem como base a hipótese da lei de Newton do resfriamento aplicada à transferência de massa. Quando se aplica esta Lei, presume-se que as condições sejam isotérmicas e que a resistência à transferência de umidade se restrinja apenas à superfície do produto (GONELI *et al.*, 2014).

Os modelos difusivos descrevem as taxas de transferência de calor e massa como função da posição dentro do sólido e do tempo de secagem. Além disso, consideram a difusão baseada na segunda Lei de Fick que descreve que o fluxo de massa por unidade de área é proporcional ao gradiente de concentração de água (GONELI *et al.*, 2014).

Os modelos baseados na termodinâmica dos processos irreversíveis assumem basicamente a validade das relações recíprocas de Onsager, o princípio de Curie e a exigência de um equilíbrio termodinâmico local no interior do produto (SILVA, 2010).

Os modelos empíricos de Page, Page modificado e de Henderson e Pabis são bastante utilizados para a representação da secagem de produtos agrícolas (MARTINAZZO *et al.*, 2007). O modelo de Page foi originado a partir da modificação do modelo exponencial de Lewis o qual foi adicionado o expoente “n” a variável tempo, como mostra a Equação 1 na Tabela 1. Já o modelo de Henderson e Pabis se basearam no modelo exponencial que foi modificado pela adição do termo “a” a equação (Equação 3) (DANTAS, 2010).

Tabela 1: Modelos matemáticos de secagem utilizados para predizer o fenômeno de secagem.

Nome	Modelo	Equação
Page	$RU = \exp(-k.t^n)$	1
Page modificado	$RU = \exp[-(kt)^n]$	2
Henderson e Pabis	$RU = a.\exp(-k.t)$	3

Fonte: Adaptado de (FERREIRA *et al.*, 2012).

Em que:

RU = razão de umidade, adimensional;

t= tempo

k= constante de secagem, h, e

a,b,c, n = coeficiente do modelo

1.8. Uso do etanol previamente à secagem

Para alguns insumos farmacêuticos ativos vegetais, apenas a secagem da planta não é suficiente para a inativação enzimática e por esse motivo há a necessidade de realizar uma etapa adicional, a estabilização. As drogas cardiotônicas, por exemplo, possuem enzimas que desdobram a cadeia glicosídica e reduzem a atividade farmacológica, tornando-se, neste caso, essencial a etapa de estabilização que constitui em inativar enzimas por aquecimento, emprego de solventes ou irradiação (BRASIL, 2014).

Os métodos de estabilização com solvente e a secagem são importantes para a conservação de alimentos e vegetais, assim como para obter um produto com alta qualidade sensorial. Sua aplicação antes da secagem possibilita modificar a estrutura natural da matéria-prima e melhorar a transferência de umidade e, portanto, aumentar a velocidade de secagem do produto (KOMPANY *et al.*, 1990). Com base nisso, a influência do uso do etanol na cinética de secagem e qualidade do produto vem sendo estudada, sobretudo, na área de alimentos (SANTOS; SILVA, 2008).

Corrêa e colaboradores (2012) avaliaram a influência do etanol na secagem por convecção de bananas (*Musa acuminata* Var. *nanica*) verdes, maduras e em estágio avançado de maturação sob atmosfera em condição normal, modificada com etanol (0,5% v/v) e tratamento da superfície das amostras com etanol em atmosfera normal. As amostras escovadas com etanol apresentaram menores tempos de secagem e de energia consumida.

Outro estudo de Santos e Silva, (2008) realizado em um secador de túnel, utilizando duas temperaturas (40 e 60 °C), sob atmosfera normal e modificada, mostrou que o uso do etanol em fatias de abacaxi reduziu o tempo de secagem e

proporcionou maior teor de ácido ascórbico, em torno de 8% a mais quando comparada com o método convencional.

1.9. Microscopia

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um instrumento versátil que permite a observação e análise das características microestruturais de materiais sólidos. O princípio de um MEV consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente (DEDAVID, 2007).

A riqueza de detalhes estruturais utilizando esse equipamento vem contribuindo para a identificação botânica de espécies semelhantes morfológicamente (SERRANO; SILVA; SILVA, 2010), diagnose de espécies (DUARTE; SIEBENROK; EMPINOTTI, 2007), controle de qualidade de vegetais comercializados e acompanhamento e avaliação da influência de processamentos na estrutura de vegetais (RITTER; MIOTTO, 2006; CUNHA *et al.*, 2004).

1.10. Cromatográfica líquida de alta eficiência

As técnicas cromatográficas de análise são amplamente empregadas para separação, sobretudo, na análise de substâncias presentes em matrizes complexas como produtos naturais. A cromatografia líquida de alta eficiência apresenta vantagens como eficiência, rapidez e quantificação de substâncias em concentrações baixas, por esse motivo vêm sendo utilizada para avaliar as características qualitativas e quantitativas de droga vegetal (LANÇAS, 2009).

1.11. Validação de método analítico

A validação tem como objetivo garantir que o método seja adequado ao que se propõe, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Os parâmetros para validação de métodos analíticos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais e internacionais por meio de documentos oficiais com as diretrizes a serem adotadas (RIBANI et al., 2004). Em 1990, as agências regulatórias dos Estados Unidos, Japão e União Européia passaram a organizar a Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH, "International Conference on Harmonisation") com o intuito de definir padrões para os procedimentos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Os critérios para validação de métodos analíticos foram estabelecidos pela ICH em 1996 nos documentos Q2A e Q2B. Em 2005, os critérios foram revisados e atualizados e o documento Q2 (R1) publicado (ICH, 2005; 1996). No Brasil, a ANVISA e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, sendo eles a Resolução da ANVISA RE nº 899 de 29 de maio de 2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008 de julho/2011, respectivamente (RIBANI, 2004).

Os parâmetros de validação preconizados pela ICH para os ensaios de identificação, teste de impurezas e teste quantitativo de princípio ativo estão exemplificados na Tabela 2.

Tabela 2: Elementos requeridos pela ICH para validação de ensaios.

Características de desempenho analítico	Identificação	Teste de impurezas		Quantitativo
		Quantitativa	Limite	
Exatidão	-	+	-	+
Precisão		+		
Repetibilidade	-	+	-	+
Precisão intermediária	-	+ (1)	-	+ (1)
Especificidade	+	+	+	+
Limite de detecção	-	- (3)	+	-
Limite de	-	+	-	-

quantificação				
Linearidade	-	+	-	+
Faixa de trabalho	-	+	-	+

Fonte: Adaptado ICH, 2005.

Em que:

- : Normalmente não avaliado;

+ : normalmente avaliado;

(1): No caso da reprodutibilidade ter sido realizada, a precisão intermediária não é necessária;

(2): a carência de especificidade em um processo analítico pode ser compensado por outro processo analítico;

(3): pode ser preciso em alguns casos.

1.11.1. Especificidade/Seletividade

De acordo com a ICH (2005), a seletividade/especificidade de um método pode ser definida como a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa.

Conforme Ribani *et al.* (2004), a seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão comprometidas. Esse parâmetro pode ser avaliado por alguns testes como relacionar a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com a substância (padrão). Caso não seja possível obter a matriz isenta da substância, o método de adição padrão pode ser utilizado. Para isto é construída uma curva analítica do padrão e outra do padrão adicionado à amostra. Curvas paralelas apontam que a matriz não interfere na determinação da substância de interesse. Também pode ser realizada a análise da equivalência das respostas (picos) do analito na amostra e de uma substância de referência pura, utilizando detectores modernos como arranjo de diodos e espectrômetro de massas.

1.11.2. Linearidade

A linearidade compreende a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003; ICH 2005). As recomendações dos guias da ANVISA e ICH para esse ensaio são do uso de, no mínimo, cinco concentrações diferentes.

O método matemático de regressão linear pode ser utilizado para efetuar a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais. Com base na equação de regressão linear, por intermédio do método dos mínimos quadrados, é possível determinar o coeficiente de correlação linear (R^2) e verificar a linearidade (VIEIRA; REDIGUIERI, 2013). A partir dos pontos experimentais também é possível calcular os coeficientes de regressão a e b (Equação 4).

$$y=ax+b,$$

Equação 4

Em que:

y= resposta medida (área do pico);

x= concentração;

a= inclinação da curva de calibração / sensibilidade

b= intersecção com eixo y, quando x=0

Uma correlação satisfatória entre os pontos resultará em um valor próximo a 1 (um), pois menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor será a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (VIEIRA; REDIGUIERI, 2013). A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (BRASIL, 2003; INMETRO., 2011).

1.11.3. Intervalo

O intervalo corresponde à faixa de concentração do analito que apresenta exatidão, precisão e linearidade aceitáveis (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). A

concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. Os valores medidos obtidos têm que estar linearmente correlacionados às concentrações, de forma que os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa de trabalho possam ser distinguidos dos brancos do método (INMETRO, 2011).

Para determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas, os guias da ANVISA e da ICH consideram o intervalo linear de 80 a 120% da concentração teórica do teste. Já para o teste de uniformidade de conteúdo, os valores considerados são de 70 a 130% da concentração teórica do teste (VIEIRA; REDIGUIERI, 2013; BRASIL, 2003; ICH, 2005)

1.11.4. Limite de detecção

O Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado (ICH, 2005). O limite de detecção pode ser determinado por várias metodologias como os métodos não instrumentais, por meio de titulação e cromatografia em camada delgada, e pelos métodos instrumentais, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa, absorção atômica. No caso de métodos instrumentais, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base e determinada pela Equação 5 (BRASIL, 2003).

$$LD = \frac{3,3XDPa}{IC}$$

Equação 5

Em que:

LD = limite de detecção;

DPa = desvio padrão do intercepto com eixo y (coeficiente linear) de no mínimo três curva;

IC = inclinação da curva de calibração (coeficiente angular).

1.11.5. Limite de quantificação

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 2005). O procedimento sinal/ruído pode ser aplicado somente para processos analíticos que exibem linha de base. O limite de quantificação (LQ) pode ser expresso pela Equação 6 abaixo.

$$\text{LQ} = \frac{10DPa}{IC} \quad \text{Equação 6}$$

Em que:

LQ = limite de quantificação;

DPa = Desvio padrão do intercepto com eixo y (coeficiente linear) de no mínimo três curvas;

IC = inclinação da curva de calibração (coeficiente angular)

1.11.6. Precisão

Consiste na avaliação da dispersão dos resultados entre ensaios múltiplos e independentes, sob condições definidas, de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões (BRASIL, 2003; INMETRO, 2011). Para este parâmetro de validação são considerados os testes de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade consiste na concordância entre os resultados de medições sucessivas mantendo procedimento, analista, instrumento e local. O ICH e ANVISA sugerem que a repetibilidade seja verificada a partir de, no mínimo, nove determinações (três níveis, três repetições em cada um) cobrindo o limite especificado do procedimento, ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado.

A precisão intermediária avalia a concordância entre os resultados sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes em tempos distintos, diferentes

analistas ou equipamentos. O número de ensaios necessários para o cálculo da CV (%), segundo a ICH e a ANVISA, são os mesmos recomendados para a repetitibilidade.

A reprodutibilidade pode ser definida como a concordância entre resultados obtidos por laboratórios diferentes, geralmente para padronização de métodos analíticos, por exemplo, para inclusão de metodologias em farmacopéias.

A precisão de um método analítico pode ser expressa pelo desvio padrão e o coeficiente de variação (CV %) de uma série de medidas conforme indicado na Equação 7.

$$CV (\%) = \frac{DP \times 100}{CMD} \quad \text{Equação 7}$$

Em que:

CV %: coeficiente de variação;

CMD: Concentração média determinada;

DP = desvio padrão.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (ANVISA, 2003).

1.11.7. Exatidão

É a proximidade dos resultados encontrados pelo método em estudos em relação ao valor real (ICH, 2005). A exatidão pode ser determinada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (Equação 8).

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}} \quad \text{Equação 8}$$

Conforme o guia do ICH e a ANVISA, a exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas de cada. Os limites preconizados para este teste são de 80% a 120% (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

1.11.8. Robustez

Segundo a ANVISA (2003), a robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em CG, bem como o tempo de extração, agitação, etc. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos.

2. JUSTIFICATIVA

A realização desse estudo é justificada pela relevância das etapas de processamento de plantas medicinais na conservação de substâncias ativas e qualidade de fitoterápicos. Dentre as etapas de processamento, está a secagem que pode ser definida como a eliminação da umidade do produto com transferência de massa e calor (MARCHESE; FIGUEIRA, 2005).

A influência da utilização do etanol na cinética de secagem e qualidade da matéria-prima vem sendo estudada, principalmente, na área de alimentos, por reduzir o tempo de secagem e reter algumas substâncias voláteis importantes (CORRÊA *et al.*, 2012; TOSATO, 2012; BRAGA; SILVA, 2010). Entretanto, não existem muitos estudos relatando o uso desse solvente na secagem de plantas medicinais, assim como o controle do processo por MEV.

Várias mudanças físicas e químicas ocorrem nos vegetais durante o processo de secagem como redução do volume, encolhimento do produto, perda da coloração, perda de compostos orgânicos e modificações mecânicas que afetam a densidade e capacidade de reidratação do material seco. Essas alterações estruturais podem ser um dos fatores responsáveis pela perda de qualidade da droga vegetal. Por esse motivo são necessários estudos que avaliem como as variáveis envolvidas no processo de secagem influenciam a cinética de secagem e a qualidade do material desidratado a fim de reduzir os danos resultantes do processo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar a influência do pré-tratamento com etanol na cinética de secagem, teor de cumarina e estrutura das folhas de guaco.

3.2. Objetivos Específicos

- ❖ Desenvolver um planejamento fatorial com o intuito de avaliar a influência das variáveis concentração de etanol e tempo de mergulhia na resposta (teor de cumarina), bem como definir o ponto ótimo de secagem;
- ❖ Avaliar a influência do pré-tratamento com etanol na cinética de secagem das folhas de guaco;
- ❖ Avaliar a estrutura foliar do guaco em diferentes condições de secagem por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- ❖ Validar um método cromatográfico para quantificar o marcador químico (cumarina) presente nos extratos das folhas guaco por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Padrão e solventes

Neste estudo foram empregados os solventes álcool etílico desnaturalizado 40B com pureza de 99,66% da marca J.T.Baker lote P20C09, metanol 99,97% grau HPLC da marca J.T. Baker lote P19C09, padrão cumarina da marca European Pharmacopoeia Reference Standards código Y0000438 Id. 007910, solução Karnovsky, tampão cacodilato de sódio 0,05M (pH 7,2), tetróxido de ósmio (OsO₄) e azul de toluidina.

4.1.2. Matéria prima

As folhas de guaco (*M. glomerata*/*M. laevigata*) foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares da Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília - DF (Figura 4).



Figura 4: Guaco cultivado no Horto de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares da Faculdade de Ceilândia/UnB.

A coleta ocorreu entre os meses de março e abril de 2015 e foi feita manualmente no período das 7 a 8 horas da manhã. O material estranho foi descartado e as folhas perfeitas foram selecionadas.

4.2. Método

4.2.1. Planejamento fatorial de experimentos

A secagem foi direcionada por um planejamento fatorial de experimentos com duas variáveis e três níveis (3^2). Foram estudadas as variáveis concentração de etanol e tempo de mergulhia, em três níveis codificados em baixo (-1), intermediário (0) e alto (+1), conforme indica a Tabela 3 e 4. No total, foram realizados dez experimentos, sendo nove tratamentos e um controle. A influência dessas variáveis em cada tratamento foi avaliada por quantificação por CLAE e a condução dos experimentos se deu de forma aleatória.

Tabela 3: Variáveis do planejamento fatorial 3^2 e seus níveis.

Variáveis independentes	Nível (-)	Nível (0)	Nível (+)
Concentração do solvente (%)	40	70	100
Tempo de mergulhia (s)	5	45	85

Tabela 4: Matriz do planejamento fatorial 3^2 .

Exp.	Variáveis codificadas		Variáveis decodificadas	
	EtOH (%)	t (s)	EtOH (%)	t (s)
F1	-1	-1	40	5,0
F2	0	-1	70	5,0
F3	1	-1	100	5,0
F4	-1	0	40	45,0
F5	0	0	70	45,0
F6	1	0	100	45,0

F7	-1	1	40	85,0
F8	0	1	70	85,0
F9	1	1	100	85,0
F10	Controle			

Neste trabalho a mergulhia em álcool etílico absoluto está representada na tabela como 100%, apenas para melhor visualização dos resultados.

4.2.2. Pré-tratamento das folhas de guaco com etanol

Para o pré-tratamento com etanol, as folhas foram limpas e separadas em três lotes, um destinado aos experimentos de cinética de secagem, o segundo para determinação do teor de umidade por dessecação em balança de infravermelho e o terceiro para microscopia e corte histológico.

Para cada lote pesou-se cerca de 10 g de folhas de guaco e posteriormente realizou-se o procedimento de mergulhia em etanol por um período que variou de 5, 45 e 85 segundos à temperatura ambiente (Figura 5).



Figura 5: Mergulhia das folhas de guaco em etanol.

4.2.3. Secagem das folhas de guaco

Após os tratamentos, as folhas foram distribuídas em monocamadas em bandejas metálicas removíveis com fundo telado, para permitir a passagem de ar, e levadas para secagem em estufa de esterilização e secagem da marca ODONTOBRÁS modelo 1.2 à temperatura de 50°C (MARTINS, 2005). As folhas que não passaram por tratamento foram igualmente dispostas em monocamadas nas bandejas e levadas para secagem em estufa. A fim de minimizar os efeitos do posicionamento das bandejas sobre a dessecação das folhas de guaco e uniformizar o processo de secagem, utilizou-se a bandeja central para todos os ensaios de secagem.

A redução de massa durante o processo foi monitorada em intervalos regulares de tempo. Na primeira hora, as folhas de guaco foram pesadas de 15 em 15 minutos, na segunda e terceira hora de 30 em 30 minutos e da quarta hora até o fim do processo de 60 em 60 minutos.

O término da secagem foi definido após obtenção de massa constante dada por três pesagens consecutivas com variação apenas em dg. Para isso, utilizou-se uma balança digital de 0,001 g de resolução da marca SHIMADZU modelo AUY 220.

A partir das pesagens das folhas no decorrer da secagem foi possível obter o teor de umidade em base úmida, teor de umidade em base seca e a razão de umidade. O teor de umidade em base úmida (b.u.) corresponde a relação entre a massa de água presente na amostra e a massa total de produto e o teor de umidade em base seca (b.s.) consiste na relação entre a massa de água contida no produto e a massa de matéria seca. A razão de umidade (RU) foi determinada por meio da expressão indicada pela Equação 9 e pode ser definida como a razão entre a quantidade de água disponível no tempo t e a quantidade total de água disponível no início do processo.

$$RU = \frac{U - U_e}{U_i - U_e}$$

Equação 9

Em que:

RU: razão de umidade do produto, adimensional;

U: teor de água do produto, decimal (b.s.);

Ui: teor de água inicial do produto, decimal (b.s.);

Ue: teor de água de equilíbrio do produto, decimal (b.s.);

Com base nos resultados, realizou-se a construção dos gráficos de curva de secagem (razão de umidade em função do tempo). Em seguida, os modelos matemáticos de Page, Page modificado e Henderson e Pabis foram ajustados aos dados de secagem das folhas de guaco.

A escolha do modelo foi realizada por meio do coeficiente de determinação (R^2), raiz do quadrado médio residual (RMES) e qui-quadrado (χ^2), calculados conforme as Equações 10 e 11. Foram eliminados os modelos que apresentavam valores de R^2 menores ou iguais a 0,95, RMSE maiores ou iguais a 0,10 e qui-quadrado (χ^2) maior que 0,01 (DOYMAZ; KIPCAK; PISKIN, 2015; NASCIMENTO; BIAGI; OLIVEIRA, 2015; MARTINAZZO *et al.*, 2007).

$$\chi^2 = \sum \frac{(MR_{exp,i} - MR_{pre,i})^2}{GLR} \quad \text{Equação: 10}$$

$$RMES = \left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (MR_{exp,i} - MR_{pred,i})^2 \right]^{1/2} \quad \text{Equação 11}$$

Em que:

MR – Razão de umidade;

MR_{exp,i} – valor observado experimentalmente;

MR_{pre,i} – valor estimado pelo modelo;

N – número de observações experimentais;

GLR – grau de liberdade do modelo.

4.2.4. Determinação do teor de umidade por dessecação em balança de infravermelho

Para esse ensaio foi utilizado um Analisador de umidade por infra-vermelho (IV 2.500) da marca GEHAKA. As condições de temperatura e tempo foram

programadas para 100°C e 30 minutos, nessa ordem. Para cada ensaio pesou-se cerca de 2,0 g de folhas. Após o tempo de 30 minutos foram feitas as leituras das massas e os valores expressos em porcentagem. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

4.2.5. Microscopia eletrônica de varredura

Com auxílio de uma lâmina, as folhas foram segmentadas em pedaços com aproximadamente 0,5 cm² de área, fixadas em solução Karnovsky por um período de 24 h e em tampão cacodilato de sódio 0,05M (pH 7,2). Em seguida, pós fixadas com tetróxido de ósmio (OsO₄) durante uma hora e foram lavadas duas vezes com água destilada. Posteriormente o material foi desidratado com série gradual de acetona 30, 50, 70, 90 e 100%, em intervalos de 15 minutos entre as trocas e levado à secagem até o ponto crítico com CO₂ em equipamento Balzers CPD030. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta modelo FEG 250 na Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília.

4.2.6. Corte histológico

Com auxílio de uma lâmina, as folhas foram segmentadas em pedaços com aproximadamente 0,5 cm² de área, fixadas em solução Karnovsky por um período de 24 h e em tampão cacodilato de sódio 0,05M (pH 7,2). Em seguida, pós fixadas em ferricianeto de potássio e tetróxido de ósmio (1:1) por 1 horas. O material foi lavado duas vezes com água destilada e permaneceu em solução a 0,5% de acetato de uranila por 12h a 4°C. Posteriormente, iniciou-se o processo de desidratação em gradiente de acetona 30, 50, 70, 90, 100 e 100% por 20 minutos. A infiltração foi realizada em série crescente acetona:resina por 6 horas. As amostras foram colocadas em formas, encobertas com resina e levadas para secagem a temperatura de aproximadamente 60°C por 48 horas. Para a análise da anatomia foliar, realizou-se o corte semi-fino dos blocos em ultramicrotomo Leica EM UC7 com facas de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina e observados em microscópio Zeiss Axiophot no Laboratório de Microscopia

Eletrônica do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (Campus Darcy Ribeiro).

4.2.7. Preparo dos extratos das folhas de guaco

Para verificar o teor de cumarina em cada experimento de secagem, foram realizadas extrações metanólicas das folhas de guaco.

Testes prévios foram efetuados com a finalidade de determinar o tempo de pulverização da droga vegetal utilizando um liquidificador. Para isso, foram testados três tempos distintos de processamento (10, 30 e 50 segundos). Notou-se que o tempo de 30 segundo foi suficiente para obter o tamanho desejado da droga vegetal.

Uma vez pulverizada, foi pesada 0,5 g da droga vegetal em pó e transferida para frascos de vidro previamente identificados. Aos frascos foram adicionados 5 mL de metanol que permaneceram em contato com a droga vegetal em pó por 15 horas (adaptado de RADÜNZ *et al.*, 2012). Em seguida, os extratos foram filtrados com filtro (PTFE) Sartorius e transferidos para frascos tipo vials identificados. Os vials foram armazenados em isopor e congelados até análise por CLAE.

4.2.8. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

As análises por CLAE foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC) da Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília (UnB).

Utilizou-se o equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência modelo Shimadzu LC 20-AD, composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um injetor automático (modelo 9SIL-20AD) e forno (modelo CTO-20AS), acoplado a um detector espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e a um computador equipado com o programa de análise cromatográfica Shimadzu LC. Com metodologia adaptada, utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) e fase móvel composta por uma eluição isocrática de metanol e água MiliQ (60:40; v/v) numa vazão de 0,8 mL.min⁻¹, volume de injeção de 20µL,

detecção UV_{274nm} e forno com temperatura de 30⁰C. O método padronizado foi validado de acordo com as diretrizes do ICH (adaptado de Lima, 2013).

4.2.9. Validação do método cromatográfico

Uma vez definida as condições cromatográficas, realizou-se a validação do método de acordo com os critérios estabelecidos pela ICH, em destaque na Tabela 1. Os parâmetros avaliados foram os de seletividade, linearidade, intervalo, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão (ICH, 2005).

4.2.9.1. Especificidade/Seletividade

Foi realizado o método de adição do padrão para testar a seletividade do método. Duas curvas analíticas foram construídas, uma com padrão cumarina adicionadas à amostra e a outra do padrão sem a presença da matriz. A partir dos resultados dos cromatogramas foi possível elaborar as curvas de calibração e comparar as linhas de regressão. O método foi considerado específico quando as linhas de regressão mostraram comportamento paralelo.

4.2.9.2. Linearidade e intervalo

A linearidade foi determinada empregando-se o método de doseamento por CLAE, utilizando diluições crescentes a partir de uma solução mãe do padrão cumarina. Para o preparo da solução mãe foram utilizados 0,01 g do padrão cumarina e 10 mL de metanol, obtendo uma concentração de 1.000 µg/mL. Em seguida, realizou-se diluições seriadas para obter as concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 15,0 µg/mL. Foram feitas cinco determinações para cada concentração. A partir dos resultados dos cromatogramas foi possível elaborar uma curva de calibração (área do pico versus concentração) e obter a curva de regressão linear, equação da reta e o coeficiente de correlação (R²). Foram

consideradas lineares as curvas que apresentaram valores de coeficiente de correlação maiores que 0,99.

O intervalo de trabalho foi determinado pelas faixas testadas na linearidade, exatidão e precisão para a metodologia.

4.2.9.3. Limites de detecção e quantificação

Para a determinação dos limites de detecção e quantificação teóricos foram realizadas diluições do padrão, a fim de obter concentrações de 0,02; 0,03; 0,04; 0,08; 0,09 e 0,10 µg/mL. Foram realizadas 5 replicatas de cada concentração e determinados os valores da média e desvio padrão. Determinou-se a regressão linear expressa pela equação de primeira ordem ($y = ax + b$), a média do coeficiente angular e o desvio padrão do coeficiente linear. Em seguida aplicou-se as Equações 5 e 6, obtendo-se o limite de quantificação e detecção, respectivamente. Foram consideradas lineares as curvas que apresentaram valores de coeficiente de correlação maiores que 0,99.

4.2.9.4. Precisão

A precisão do método foi determinada pelo ensaio de repetibilidade e precisão intermediária. A partir dos resultados obtidos foram calculados o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV).

A repetibilidade foi determinada por doseamento por CLAE do padrão cumarina com concentração de 15,0 µg/mL realizado no mesmo dia, pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento e laboratório, porém em curtos intervalos de tempo. A partir dos valores das áreas dos picos, foi realizado o calculado do coeficiente de variação (CV). Não se admitindo valores superiores a 5%.

A precisão intermediária foi determinada conforme descrito para a repetibilidade, porém, as análises foram realizadas em dias consecutivos, pelo mesmo analista.

4.2.9.5. Exatidão

Três concentrações distintas do padrão cumarina (0,5, 5,0 e 15 µg/mL) foram utilizadas para esse ensaio, sendo que cada concentração foi realizadas em triplicata. A exatidão foi obtida pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente e expressa em porcentagem. Os limites para esse ensaio segundo a ICH são de 80 a 120%

4.3. Análise estatística

Os gráficos de cinética de secagem foram elaborados utilizando o programa Microsoft Excel 2010. Foram realizadas as análises estatísticas da raiz do quadrado médio residual (RMES) e qui-quadrado (χ^2).

A linearidade foi determinada a partir dos resultados dos cromatograma. A curva de calibração (área do pico versus concentração) foi construída com a finalidade de obter a curva de regressão linear, equação da reta e o coeficiente de correlação (R^2). Para isso foi utilizado o programa Microsoft Excel 2010. Também foi realizada a análise de variância (ANOVA) na regressão com confiabilidade de 95% ($p < 0,05$). Se o F calculado \geq valor-p, existe relação linear entre as variáveis e a inclinação da reta de regressão não é nula.

A especificidade do método validado foi realizada a partir dos resultados dos cromatograma. As curvas de calibração (área do pico versus concentração) foram elaboradas utilizando o programa Microsoft Excel 2010.

Para verificar se houve diferença significativa entre os valores obtidos nos ensaios de precisão intermediária, foi aplicada a análise de variância (ANOVA). O valor de F calculado $<$ F crítico, confirma a precisão do método.

A diferença significativa entre os resultados de quantificação por CLAE foi realizada empregando o teste t de Student.

O diagrama de Pareto, gráficos de superfície resposta e curva contorno foram elaborados utilizando o programa STATISTICA 12.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Modelagem matemática

Com os dados das pesagens em intervalos regulares de tempo foi possível construir as curvas experimentais de secagem (razão de umidade em função do tempo de secagem) para cada tratamento. Em seguida, foi feito o ajuste dos dados aos modelos de Page, Page modificado e Henderson e Pabis. Os critérios utilizados neste trabalho para verificar a adequação dos modelos em estudo foram os valores de coeficiente de determinação (R^2) maiores que 0,95, qui-quadrado (χ^2) menor ou igual a 0,01 e raiz do quadrado médio residual (RMSE) menor ou igual a 0,10. A Tabela 5 mostra os parâmetros de ajuste de cada modelo matemático e os valores do coeficiente de determinação, qui-quadrado e erro médio quadrado.

Tabela 5: Parâmetros obtidos para o ajuste do modelo matemático de secagem das folhas de guaco e valores do coeficiente de determinação (R^2), qui-quadrado (χ^2) e raiz do quadrado médio residual (RMSE).

Modelo	Exp.	Parâmetros		χ^2	RMSE	R^2
		k	n			
	40% 05s	0,0057	1,0120	0,0024	0,0470	0,9790
	40% 45s	0,0014	1,2386	0,0008	0,0283	0,9970
	40% 85s	0,0017	1,1960	0,0017	0,0400	0,9872
	70% 05s	0,0004	1,3533	0,0038	0,0593	0,9891
Page	70% 45s	0,0031	1,0852	0,0009	0,0283	0,9935
	70% 85s	0,0026	1,1199	0,0021	0,0435	0,9939

	1000% 05s	0,0018	1,2211	0,0002	0,0123	0,9994
RU = exp(-k.tⁿ)	100% 45s	0,0026	1,1711	0,0004	0,0198	0,9985
	100% 85s	0,001	1,2169	0,0041	0,0608	0,9985
	Controle	0,0449	1,1775	0,0013	0,0449	0,9939
	Exp.	Parâmetros		χ²	RMSE	R²
	k	n				
	40% 05s	0,0061	1,0125	0,1166	0,3248	0,9790
	40% 45s	0,0051	1,2386	0,0008	0,0283	0,9919
	40% 85s	0,0048	1,1960	0,0018	0,0400	0,9872
Page Modificado	70% 05s	0,0038	1,2653	0,0031	0,0528	0,9891
	70% 45s	0,0048	1,0852	0,0008	0,0282	0,9935
	70% 85s	0,0049	1,1199	0,0021	0,0435	0,9939
RU = exp[-(kt)ⁿ]	1000% 05s	0,0056	1,2211	0,0002	0,0123	0,9994
	100% 45s	0,0062	1,1711	0,0004	0,0197	0,9985
	100% 85s	0,0004	1,2169	0,0079	0,0842	0,9985
	Controle	0,0036	1,1775	0,0022	0,0449	0,9939
	Exp.	Parâmetros		χ²	RMSE	R²
	k	a				
	40% 05s	0,7582	2,1344	0,1989	0,4242	0,9617
	40% 45s	0,0060	1,1320	0,0020	0,0430	0,9840
Henderson e	40% 85s	0,0083	1,9441	0,1247	0,3359	0,9519

Pabis	70% 05s	0,0078	2,1149	0,1914	0,4151	0,9193
	70% 45s	0,0063	1,3019	0,0137	0,1173	0,9504
	70% 85s	0,0079	1,8263	0,1023	0,3042	0,9602
RU=a.exp(-k.t)	1000% 05s	0,0077	1,3396	0,0120	0,1043	0,9747
	100% 45s	0,0077	1,3396	0,0160	0,1196	0,9939
	100% 85s	0,0058	1,3949	0,0246	0,1483	0,9580
	Controle	0,0056	1,6882	0,0600	0,2372	0,9598

Dentre os modelos testados, apenas o modelo de Page apresentou ajuste apropriado para descrever a secagem das folhas de guaco. Os valores do coeficiente de determinação para esse modelo foram superiores a 0,97. Segundo Sousa e colaboradores (2013), a seleção dos modelos de secagem não deve ser realizada utilizando apenas o coeficiente de determinação como critério de avaliação. Para esse fim, outros parâmetros estatísticos devem ser analisados. Com base nisso, também foram avaliados os valores do teste qui-quadrado e raiz do erro médio quadrado. Os resultados obtidos ficaram entre 0,0002 e 0,0041 para o teste qui-quadrado e 0,01 e 0,06 para a raiz do quadrado médio residual. Tendo em vista isso, o modelo de Page foi utilizado para análise dos resultados deste trabalho.

Verificou-se que esse modelo de Page também foi empregado para representar a secagem de outras espécies vegetais, como a carqueja, *Baccharis trimera* (RADÜNZ *et al.*, 2011) e *Lippia alba* (MILL) N.E. BROWN (BARBOSA *et al.*, 2007).

5.2. Cinética de secagem

O teor de umidade inicial das folhas de guaco foi de 83,35% b.u. O controle atingiu o teor de umidade de equilíbrio (8,30% b.u) após 1.200 minutos. As folhas tratadas com etanol 40% apresentaram teor de umidade de equilíbrio de 7,17;

9,43 e 8,44% b.u. para os tempos de 5, 45 e 85 segundos, respectivamente. Os valores do teor de umidade de equilíbrio para os tratamentos com etanol 70% nos tempos de 5, 45 e 85 segundos, foram de 7,73; 8,45 e 7,59% b.u., nessa ordem. As folhas tratadas com etanol absoluto apresentaram teor de umidade de equilíbrio de 7,03% b.u. para o tempo com mergulhia de 5 segundos, 7,95% b.u. para 45 segundos e 6,98% b.u. para 85 segundos.

Quanto à duração do processo de secagem, os experimentos os quais o etanol 40% foi empregado alcançaram o teor de umidade de equilíbrio após 840, 960 e 840 minutos para os tratamentos com mergulhia de 5, 45 e 85 segundos, respectivamente. O tempo de secagem para os tratamentos em que foram usados etanol 70% foram de 780, 840 e 840 minutos para os tempos de mergulhia de 5, 45 e 85 segundos. E por fim, a duração da secagem das folhas tratadas com etanol absoluto e mergulhia de 5, 45 e 85 segundos que foram equivalentes a 840, 720 e 720 minutos, nessa ordem.

Os dados experimentais e estimados do teor de umidade empregando-se a equação de Page estão representadas nas Figuras 6 - 11.

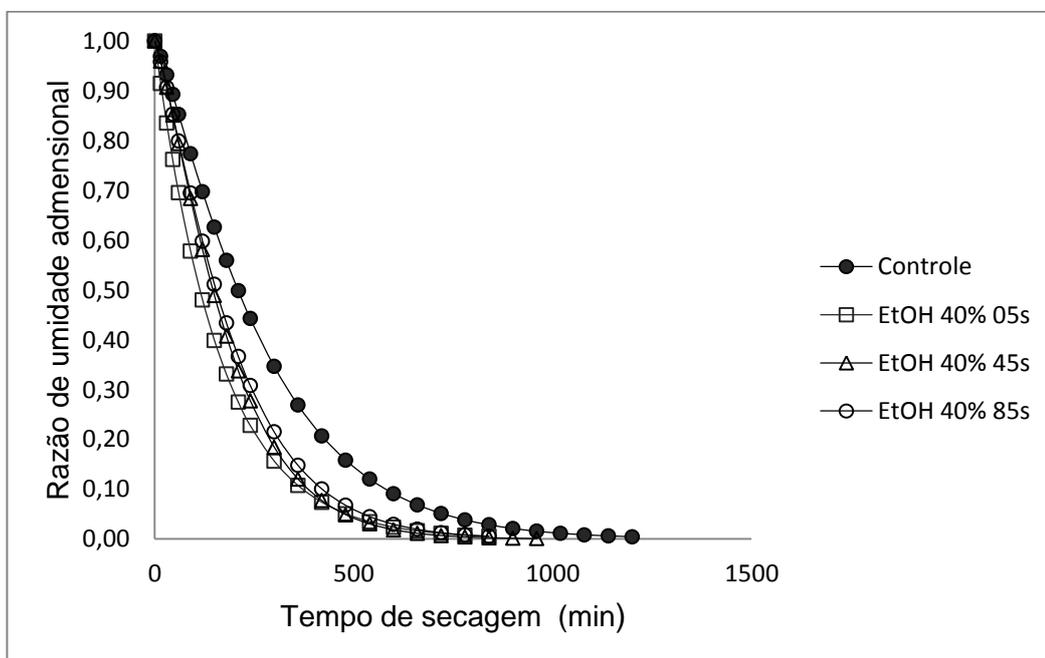


Figura 6: Curva de secagem do controle e das folhas de guaco tratadas com etanol 40% em tempos distintos de mergulhia (5,45 e 85 s).

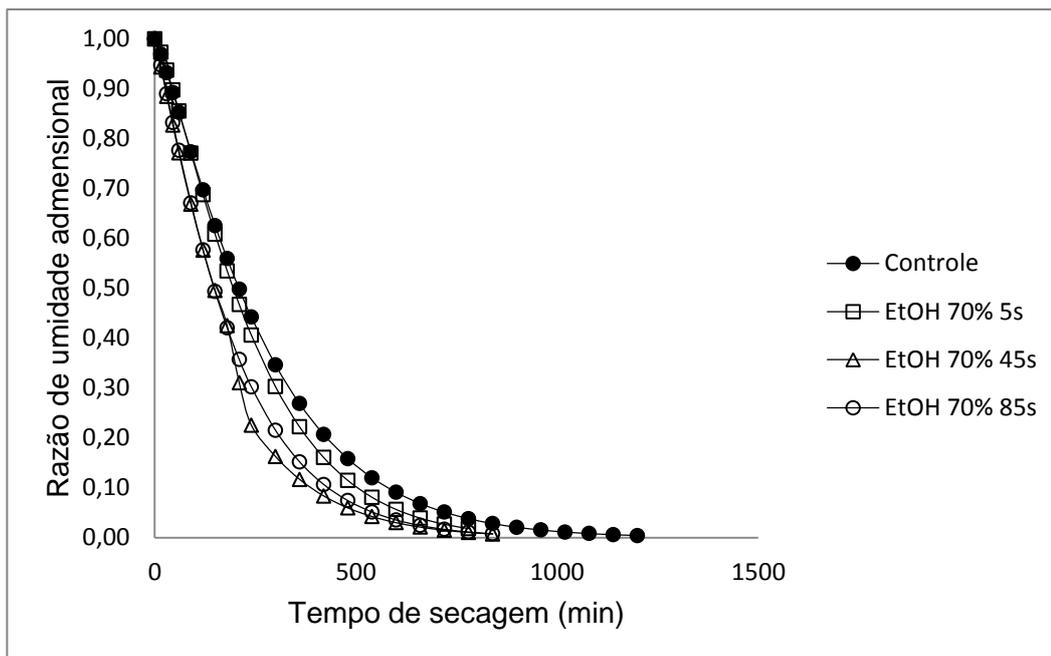


Figura 7: Curva de secagem do controle e das folhas de guaco tratadas com etanol 70% em tempos distintos de mergulhia (5,45 e 85 s).

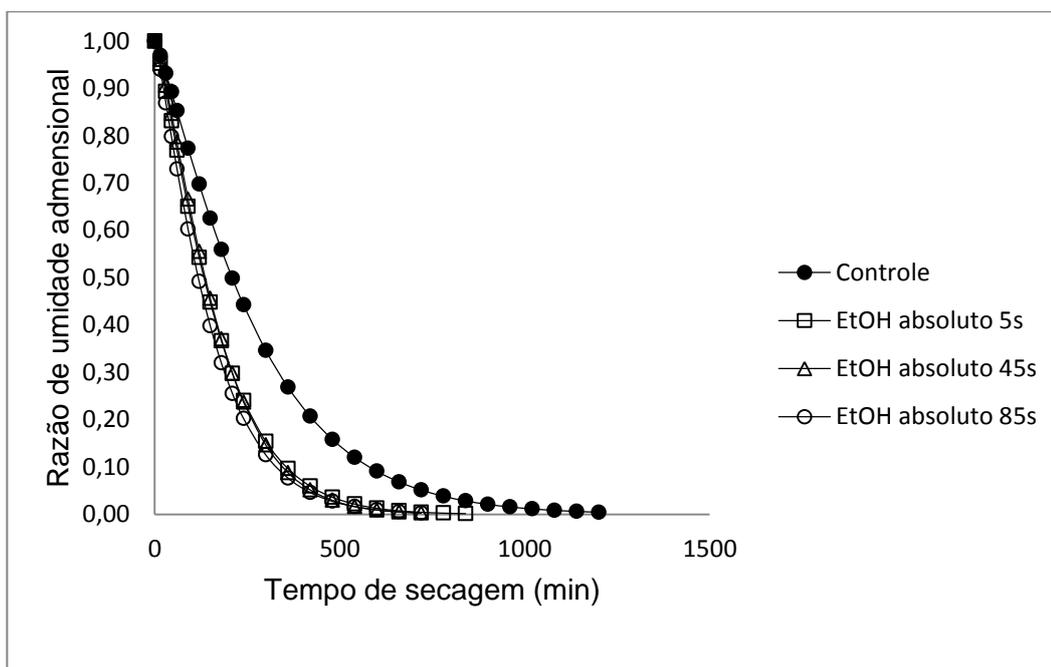


Figura 8: Curva de secagem do controle e das folhas de guaco tratadas com álcool etílico absoluto em tempos distintos de mergulhia (5,45 e 85 s).

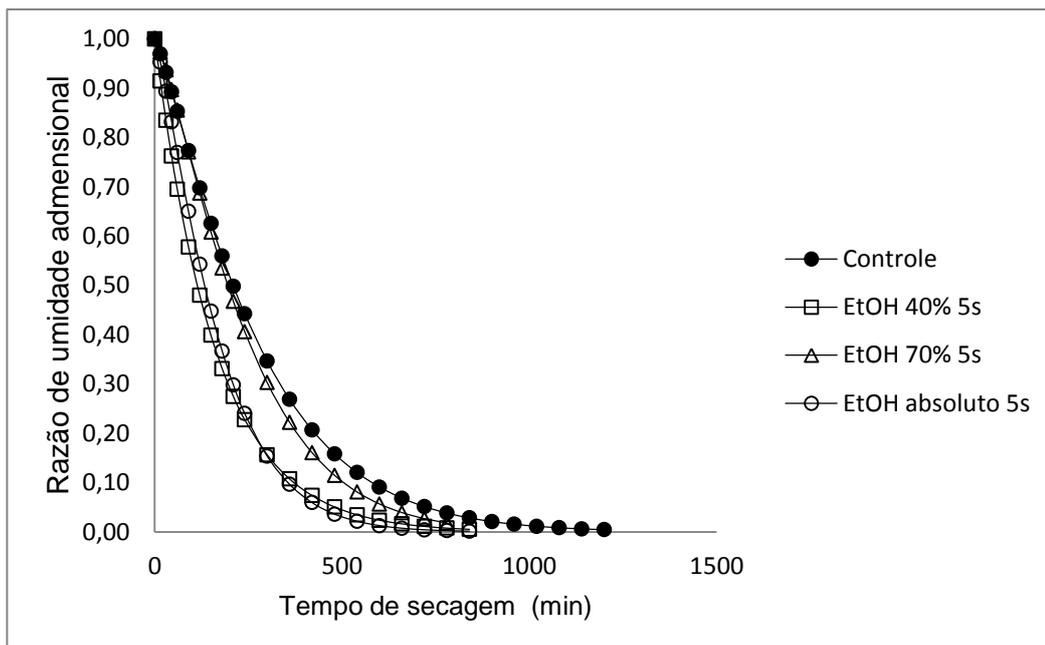


Figura 9: Curva de secagem do controle e das folhas de guaco tratadas com etanol em concentrações distintas (40, 70 e 100%), avaliando o tempo de mergulhia de 5 s.

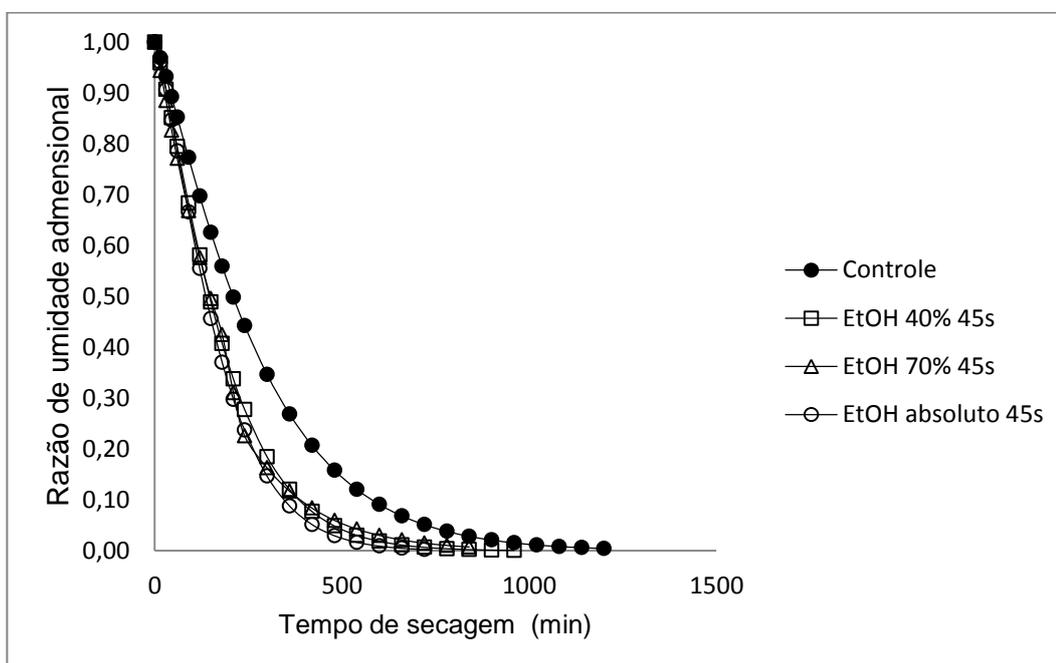


Figura 10: Curva de secagem do controle e das folhas de guaco tratadas com etanol em concentrações distintas (40, 70 e 100%), avaliando o tempo de mergulhia de 45 s.

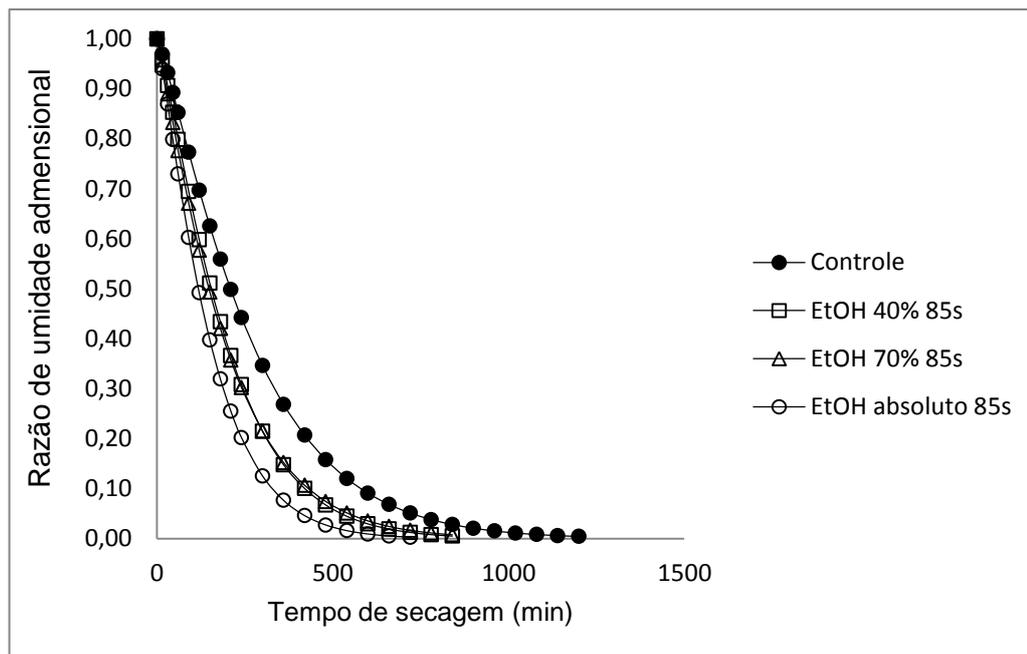


Figura 11: Curva de secagem do controle e das folhas de guaco tratadas com etanol em concentrações distintas (40, 70 e 100%), avaliando o tempo de mergulhia de 85 s.

As curvas de secagem das folhas tratadas com etanol (40, 70 e 100%) em tempos distintos de mergulhia (5, 45 e 85s) e do controle apresentaram intensa perda do conteúdo de umidade nas primeiras horas do processo. Já no fim da secagem a perda de água ocorreu de forma lenta. Esse fenômeno pode estar relacionado com o fato de que no início do processo há um alto conteúdo de umidade no tecido vegetal com a formação de um filme contínuo de água sobre o sólido mantendo as condições de saturação na superfície. Já no término da secagem, boa parte do teor de umidade já evaporou e o conteúdo de umidade tem que migrar do interior para a superfície do produto.

De maneira geral, o uso do etanol influenciou na remoção do conteúdo de umidade, sendo maior nas folhas tratadas quando comparadas ao controle. Os menores tempos de secagem foram observados para os tratamentos com álcool etílico absoluto nos tempos de mergulhia de 45 e 85 segundos com redução de 4% no tempo de secagem em relação ao controle.

O etanol de certa forma colabora com a difusão e liberação do conteúdo de água para o ambiente, reduzindo o tempo de secagem. Esse fenômeno pode estar relacionado à mistura do solvente com a solução aquosa da amostra

resultando em uma mistura etanol-água com pressão de vapor maior do que a contendo somente água, contribuindo com a evaporação de água e redução do tempo de secagem (Hochheim; Silva; Braga (2010) apud Lopes (2013)).

5.3. Influência do uso do etanol e da secagem na estrutura foliar do guaco

Essa parte do estudo teve como objetivo investigar as mudanças físicas decorrentes do uso do etanol e da secagem na estrutura foliar do guaco, bem como avaliar as características morfoanatômicas.

As alterações observadas com a desidratação das folhas de guaco foram: mudanças na coloração, odor e encolhimento.

O encolhimento das folhas de guaco foi constatado em todas as condições estudadas. Por MEV foi possível verificar que as folhas tratadas com etanol apresentaram maiores encolhimentos quando comparadas ao controle (Figura 12; Figura 13; Figura 14 e Figura 15).

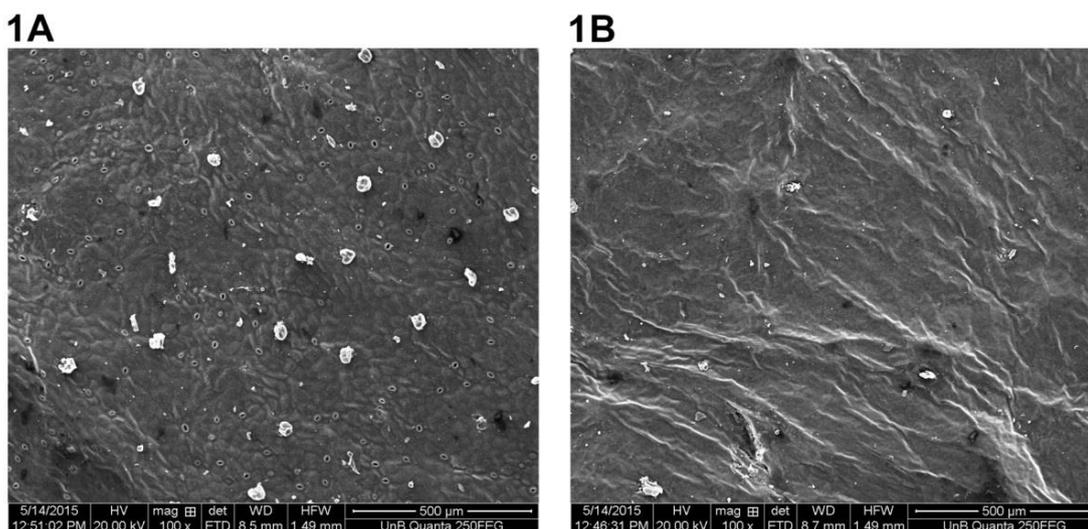


Figura 12: MEV. Superfície abaxial (A) e adaxial (B) das folhas de guaco retirada ao término da secagem. Secagem do controle (1A-B). Escala: (500 μ m), 100 X.

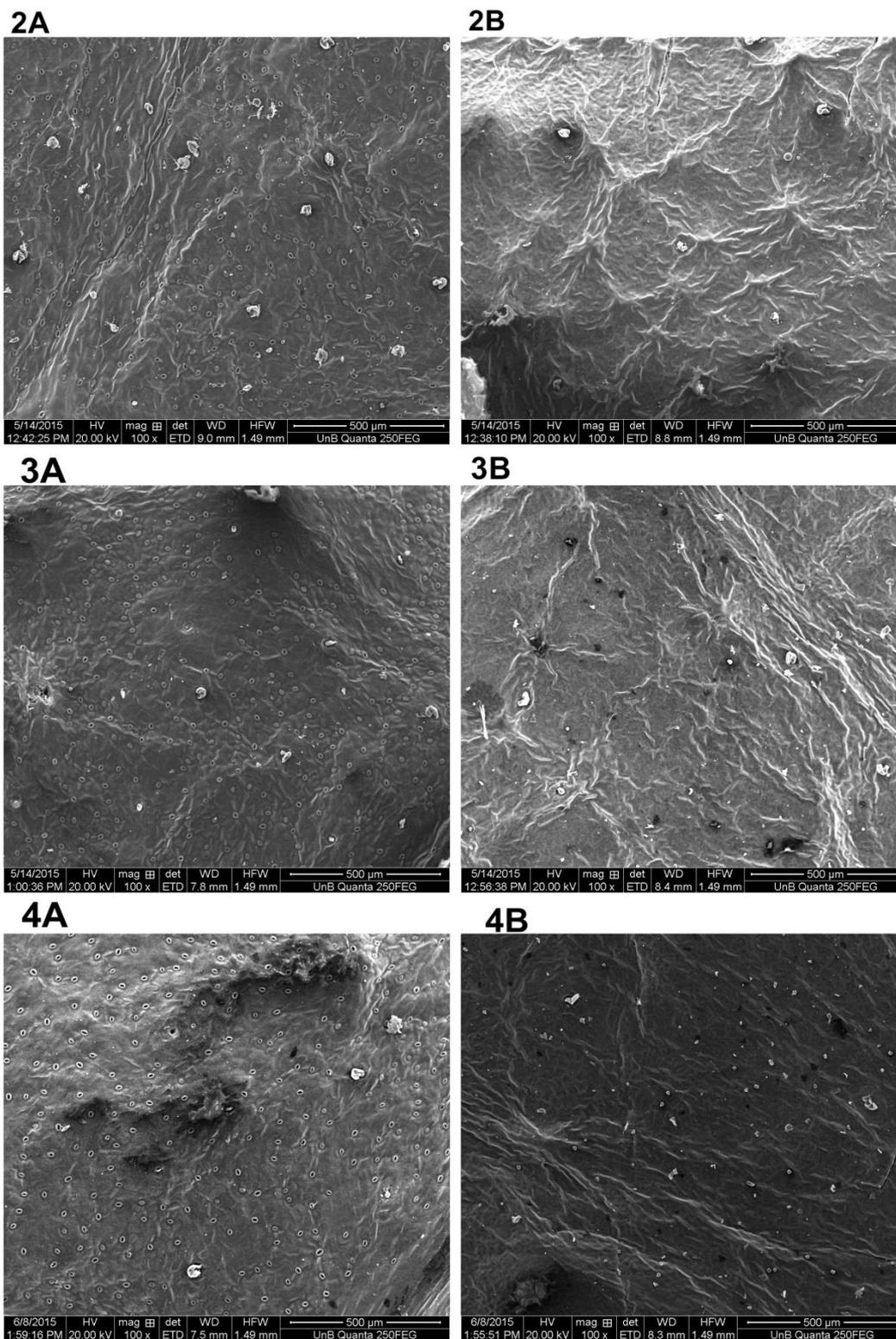


Figura 13: MEV. Superfície abaxial (A) e adaxial (B) das folhas de guaco retirada ao término da secagem. Tratamento com etanol 40% e mergulhia de 5 segundos (2 A-B); Tratamento com etanol 40% e mergulhia de 45 segundos (3 A-B);

Tratamento com etanol 40 % e mergulhia de 85 segundos (4 A-B). Escalas: 500 μ m, 100 X.

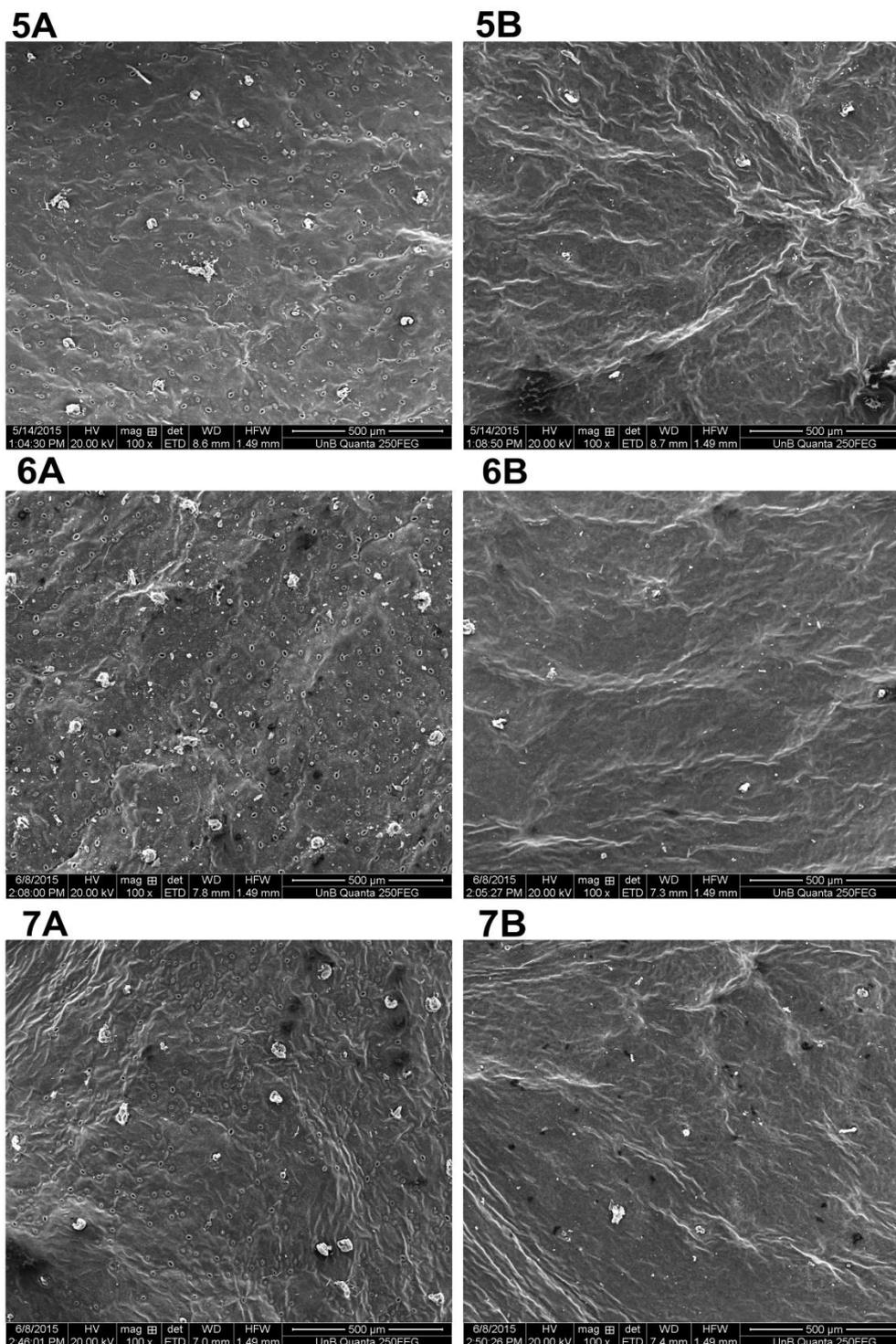


Figura 14: MEV. Superfície abaxial (A) e adaxial (B) das folhas de guaco retirada ao término da secagem. Tratamento com etanol 70% e mergulhia de 5 segundos (5 A-B); Tratamento com etanol 70% e mergulhia de 45 segundos (6 A-B);

Tratamento com etanol 70% e mergulhia de 85 segundos (7 A-B). Escalas: 500 μm , 100 X.

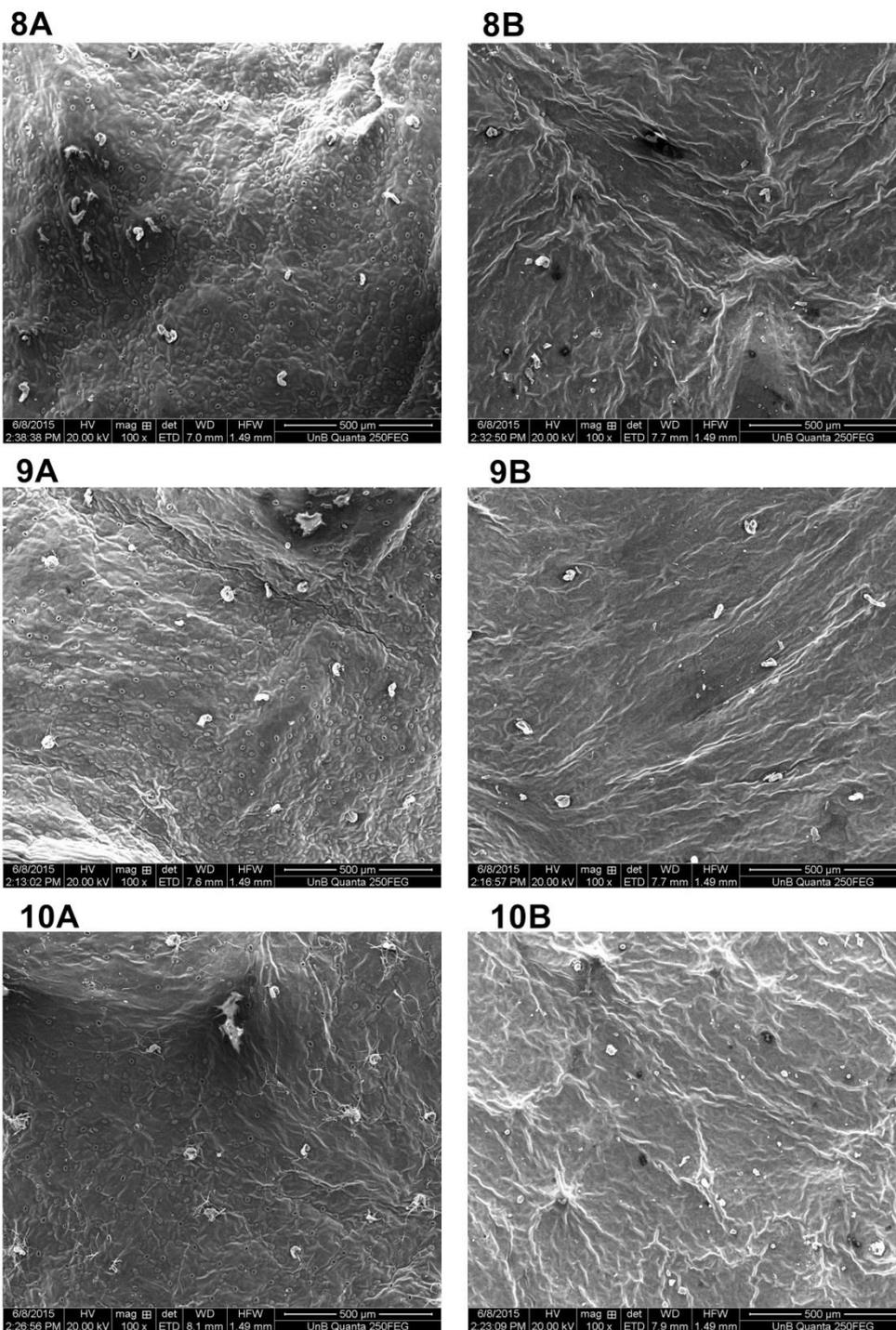


Figura 15: MEV. Superfície abaxial (A) e adaxial (B) das folhas de guaco retirada ao término da secagem. Tratamento com etanol 100% e mergulhia de 5 segundos (8 A-B); Tratamento com etanol 100% e mergulhia de 45 segundos (9 A-B);

Tratamento com etanol 100% e mergulhia de 85 segundos (10 A-B). Escalas: 500 μm , 100 X.

A secagem de produtos agrícolas com alto teor de umidade é acompanhada por uma série de mudanças físicas e químicas importantes. Uma mudança perceptível desse processo é a redução do volume do material decorrente da remoção do conteúdo de umidade durante a secagem com conseqüente encolhimento.

Quando a umidade é removida dentro da rede sólida de um produto durante a secagem, um desequilíbrio de pressão é produzido entre a parte interna e externa do material, gerando tensões que levam ao encolhimento das folhas, mudanças na forma e às vezes podem levar a formação de fissuras (MAYOR; SERENO, 2004). A extensão do encolhimento varia conforme as características de cada material e método de secagem utilizado.

Levando em consideração os resultados obtidos na cinética de secagem, os quais as folhas tratadas com etanol apresentaram maior remoção do conteúdo de umidade e menor tempo de secagem em comparação com o controle, podemos dizer que esses resultados estão de acordo com a descrição de Mayor e sereno (2004) para o fenômeno de encolhimento. Segundo os autores o encolhimento de materiais biológicos aumenta com o aumento do conteúdo de umidade removido, uma vez que, quanto maior a quantidade de água removida do material, maiores serão as tensões de contração originadas no interior do mesmo.

As concentrações do solvente também influenciaram no encolhimento das folhas, conforme indicam as Figuras 15 8A - 10B que mostram as microfotografias obtidas por MEV da superfície abaxial e adaxial das folhas tratadas com álcool absoluto e diferentes tempos de mergulhia. Dentre os tratamentos avaliados, o encolhimento mais pronunciado foi observado para as folhas tratadas com etanol absoluto, sendo maior na porção adaxial. A remoção da água durante a secagem depende da sua migração pelo tecido vegetal até a superfície. Por esse motivo as características da planta como as paredes e disposição celular, presença de tricomas, estômatos, cutícula são tão importantes no processo de secagem. Os estômatos estão relacionados com a troca de gases e água entre as folhas e o

meio e os tricomas tem papel na defesa mecânica e química contra herbívoros, além de alterar a fisiologia, reduzindo a quantidade de luz absorvida pelas folhas, baixando as temperaturas e diminuindo a perda de água (STANGARLIN *et al.*, 2011). As folhas de guaco apresentam estômatos apenas na parte abaxial bem como uma grande quantidade de tricomas nessa porção da folha. Esses anexos da planta desempenham papel importante para evitar a perda de água e podem ter contribuído para o encolhimento mais uniforme dessa região quando comparada a porção adaxial.

Além disso, foi observado que o tempo de mergulhia também influenciou no processo do encolhimento nos tratamentos utilizando etanol 70% e absoluto. As folhas que passaram por esses tratamentos apresentaram maiores deformações quando comparadas às folhas tratadas com etanol 40% e mesmo tempo de mergulhia.

Tosato, (2012) avaliou a influência do etanol na secagem de maçã fuji e notou que as amostras tratadas com etanol apresentaram maiores danos estruturais que foram identificados na superfície por micrografia. Constatou-se que a temperatura teve influência significativa no encolhimento superficial das amostras não tratadas com etanol, sendo maior em temperaturas mais elevadas.

Já Hochheim *et al.* (2010) verificou em seu trabalho sobre o encolhimento de abacaxi submetido à secagem em atmosfera modificada pela adição de etanol que a aplicação de uma camada de etanol diretamente na superfície da amostra resultou em um menor encolhimento.

A importância do estudo do encolhimento de materiais biológicos se deve ao fato de que durante o processo de secagem esse fenômeno interfere de maneira decisiva na difusividade de água. Entender como o conteúdo de umidade está distribuído no tecido vegetal e sua remoção durante a secagem também são de grande relevância para fundamentar o processo de secagem.

No que diz respeito às características morfoanatômicas, a folha de *M. glomerata*/*M. laevigata* é hipoestomática com estômatos anomocítico localizados apenas na porção abaxial e no mesmo nível que as outras células. Tricomas glandulares pluricelulares bisseriados, unisseriados e curvo estão inseridos em depressões na epiderme de ambas as faces, sendo observados, principalmente, na porção abaxial. Em secção transversal, a epiderme mostra-se uniestratificada

em ambas as faces, as células apresentam paredes periclinais externas, revestidas por cutícula delgada e formas diversificadas que variam de retangular a cúbica. As células da face abaxial são relativamente menores quando comparadas com as da face adaxial. O mesofilo de *M. glomerata*/*M. laevigata* apresenta simetria dorsiventral constituído de uma a duas camadas de parênquima paliçádico caracterizado por células curtas pequenas, alongadas, de tamanhos e formas variáveis (Figura 17 A - B). O parênquima lacunoso é constituído de células de tamanhos e forma irregular com grande espaço entre elas (Figura 17 C).

Conforme indicam as Figuras 17 D e E, a secagem promoveu mudanças importantes e irreversíveis na organização celular e estrutura das folhas para todos os tratamentos e controle. Por MEV foi possível observar tricomas pluricelular bisseriado e curvos murchos e/ou rompidos (Figura 16).

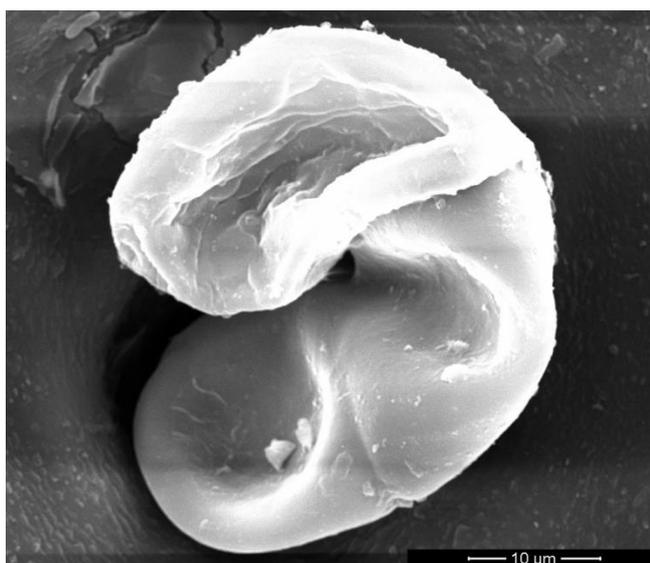


Figura 16: Tricoma glandular na superfície abaxial da folha de guaco seca que passou por tratamento em etanol 40% e mergulhia de 45 segundo. Escalas: 10 μm .

Santana et al. (2014) estudaram as alterações na estrutura durante a secagem de frutas e vegetais. Verificou-se a ruptura de tricomas glandulares nas folhas de *Ocimum gratissimum* o que pode ter influenciado no teor de óleos essenciais durante o método de secagem.

Em secção transversal é possível verificar células descaracterizadas, formação de uma crosta acima da epiderme e redução na espessura das folhas Figura 17.

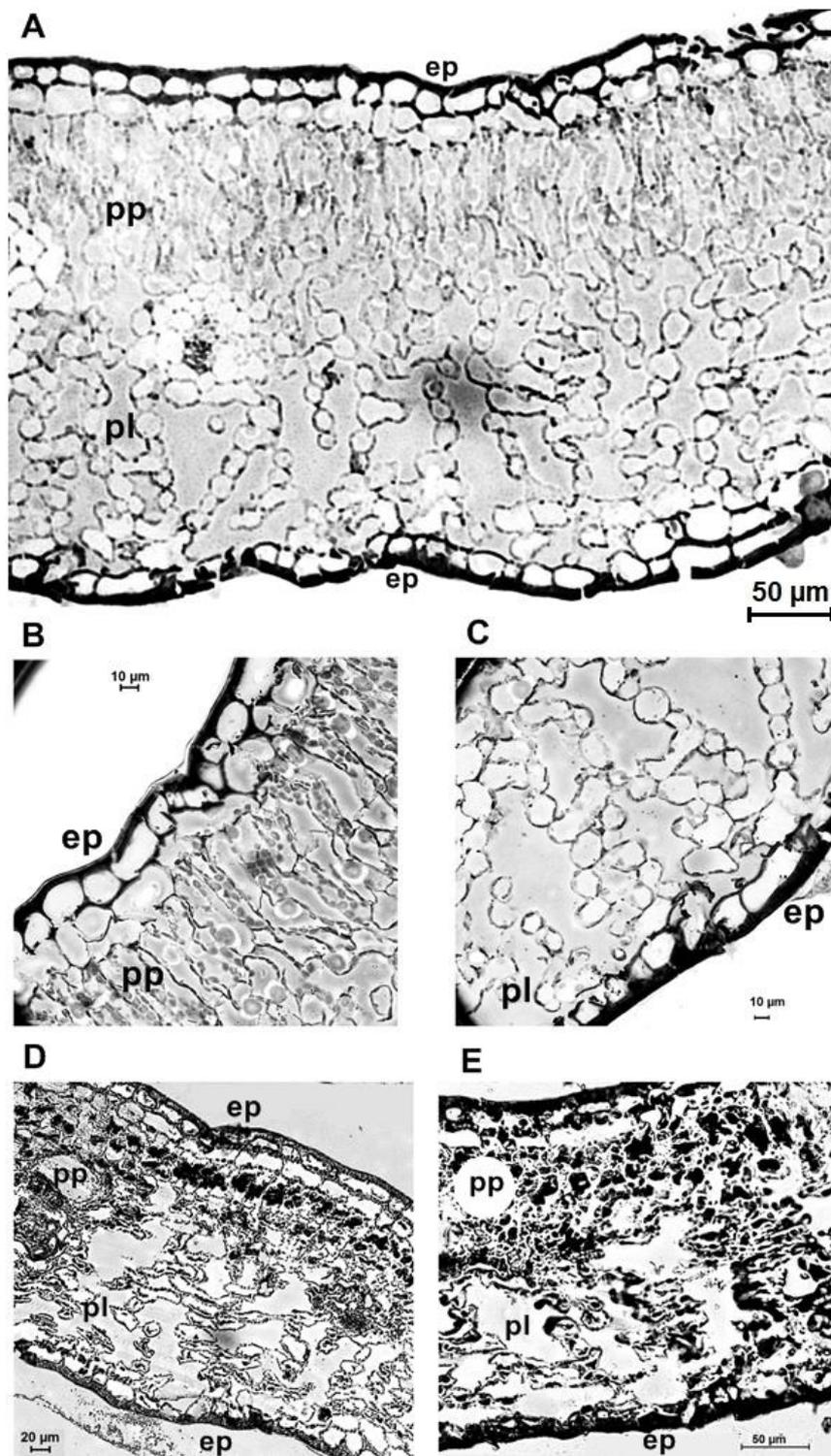


Figura 17: Secções transversais das folhas de guaco. Folha fresca (A-C); Folha desidratada (D-E). Epiderme (ep); Parênquima paliçádico (pp); Parênquima

lacunoso (pl); Folha fresca sem tratamento (A), Escala: 50 μm , 20 X; Parênquima paliçádico da folha fresca sem tratamento (B), Escala: 10 μm , 40 X; Parênquima lacunoso da folha fresca sem tratamento (C), Escala: 10 μm , 40 X; Folha desidratada que não passou pelo tratamento com etanol (D), Escala: 20 μm , 20 X; Folha desidratada que passou por tratamento com etanol absoluto e mergulhia de 45 segundos (E), Escala: 50 μm , 20 X.

As células da epiderme, em ambas as faces, apresentam poucas mudanças na forma com células que variam de retangular a cúbica. As camadas de parênquima paliçádico são de difícil reconhecimento, com células colapsadas, disformes e estruturas celulares descaracterizadas e muitas vezes concentradas em uma região do tecido vegetal. O parênquima lacunoso apresentou células com forma irregular, estruturas celulares descaracterizadas e grande espaço de ar entre as células.

As secções transversais das folhas secas do controle e tratamento estão indicadas nas Figuras 17 (D – E). Maiores danos estruturais são observados nas folhas tratadas com etanol, o que pode estar relacionado à maior remoção do conteúdo de umidade do tecido vegetal.

5.4. Validação do método cromatográfico

Para a validação do método cromatográfico, foram avaliados os parâmetros seletividade, linearidade, intervalo, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão.

5.4.1. Especificidade/Seletividade

A seletividade do método foi determinada pela comparação do perfil cromatográfico dos padrões em relação ao perfil obtido das amostras. Não houve coeluição e sobreposição de picos de substâncias interferentes com o pico de cumarina. Os tempos de retenção correspondentes aos picos de cumarina dos cromatogramas dos extratos metanólicos das folhas de guaco secas e do padrão

cumarina foram de 3,80 minutos. A Figura 18 mostra o cromatograma do pico de cumarina referente ao padrão na concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ (A) e do extrato metanólico de folhas de guaco que foram tratadas com etanol 70% e mergulhia de 5 segundos (B).

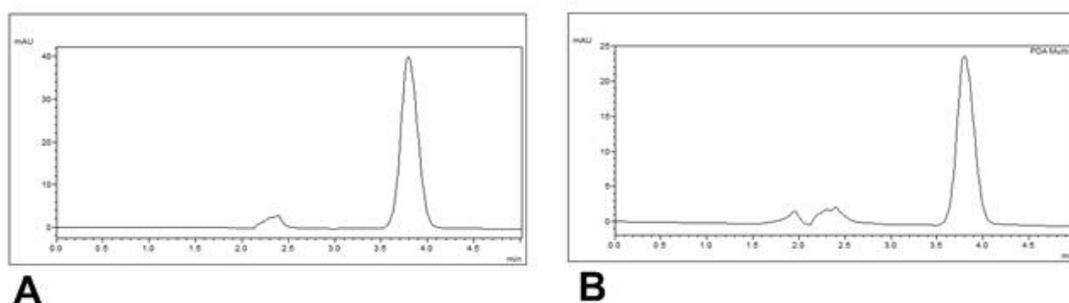


Figura 18: Cromatogramas do pico de cumarina de uma solução do padrão (5 $\mu\text{g/mL}$) (A) e da amostra (B) obtidos empregando-se CLAE. Condições cromatográficas: volume de injeção de 20 μL , vazão de 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, eluição isocrática metanol:água MiliQ (60:40) v/v, UV - 274 nm, temperatura do forno de 30 $^{\circ}\text{C}$ e coluna C18 de fase reversa: 150 mm x 4,6 mm, 5 μm .

Além disso, o método de adição do padrão também foi realizado para testar a seletividade. Para essa análise, duas curvas analíticas foram construídas, uma com padrão cumarina adicionadas à amostra e a outra do padrão sem a presença da matriz. As duas curvas analíticas foram paralelas, demonstrando que não há interferência da matriz na determinação da cumarina. Portanto, o método é considerado seletivo.

5.4.2. Linearidade

A linearidade foi determinada empregando-se o método de doseamento por CLAE utilizando diluições crescentes a partir de uma solução mãe do padrão cumarina. Foi estabelecida pela média de cinco curvas do padrão, as quais foram obtidas em seis níveis de concentrações diferentes de cumarina (15,0; 10,0; 5,0; 2,5, 1,0 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$). A equação da regressão linear média obtida a partir de três

curvas de calibração foi $y = 106125x - 3722,8$ em que “y” corresponde à área do pico e “x” a concentração de cumarina ($\mu\text{g/mL}$), como indica a Figura 19.

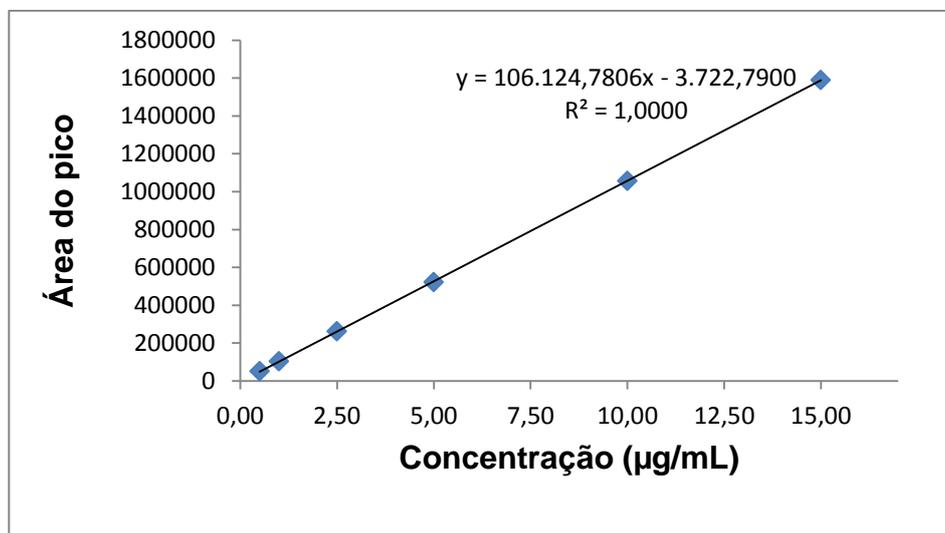


Figura 19: Curva de calibração construída com padrão cumarina para avaliar a linearidade do método.

A curva apresentou valor de coeficiente de correlação linear superior a 0,99, mostrando que o método é linear. A análise de variância (ANOVA) também foi utilizada para avaliar a linearidade do método com confiabilidade de 95% ($p < 0,05$). O valor de F calculado foi maior que o valor de p, comprovando a relação linear.

O intervalo de aplicação foi avaliado pelas faixas testadas na linearidade, exatidão e precisão, sendo de 0,5 a 15 $\mu\text{g/mL}$.

5.4.3. Limite de detecção e Limite de quantificação

A partir dos resultados dos cromatograma, foram construídas 5 curvas de calibração utilizando seis concentração do padrão cumarina (0,02; 0,03; 0,04; 0,08; 0,09 e 0,10 $\mu\text{g/mL}$). Os limites de detecção e quantificação foram de 0,03 e de 0,09 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

5.4.4. Precisão

Este parâmetro foi avaliado em dois níveis: a repetibilidade e a precisão intermediária. Os resultados da precisão para o método proposto foram expressos como coeficiente de variação. Segundo o ICH, não se admite valores superiores a 5%. O valor para a repetibilidade foi de 0,10% e para a precisão intermediária os valores do coeficiente de variação foram de 0,31 e 0,73% para os dias 1 e 2, respectivamente. A observância de diferença estatisticamente significativa entre as médias obtidas para os ensaios realizados em dias diferentes foi determinada aplicando-se a análise de variância (ANOVA). O F calculado ($F_{\text{cal}} = 1,2813$) foi menor que o F tabelado ($F_{\text{t}} = 5,3176$), mostrando que não existe diferença significativa nos valores testados em dias distintos.

5.4.5. Exatidão

Após determinação da linearidade, intervalo e especificidade, avaliou-se a exatidão do método. Os limites para esse ensaio segundo a ICH são de 80 a 120%, os valores obtidos nesse estudo foram de 100,67 a 103,18 %, indicando a exatidão do método.

5.5. Planejamento fatorial e doseamento

Para avaliar a influência das variáveis independentes (concentração de etanol e tempo de mergulhia) sobre a variável dependente (teor de cumarina), foi elaborado um planejamento fatorial de duas variáveis em três níveis.

Os extratos foram preparados na proporção de 1 g da droga vegetal para 10 mL de metanol e diluídos 100 vezes para quantificar a cumarina dentro da faixa validada. Após os cálculos de correção da diluição, foram obtidos valores expressos em mg de cumarina por grama de folha. Os valores médios das triplicatas da cumarina quantificada por CLAE estão indicados na Tabela 6.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 6, é possível observar que o tratamento das folhas com etanol (40, 70 e 100%) nos tempos de mergulhia

de 5 e 45 segundos proporcionaram maiores teores de cumarina em relação ao controle.

Tabela 6: Dados da quantificação da cumarina dos extratos metanólicos das folhas de guaco nos diferentes experimentos.

EtOH (%)	Tempo de Mergulhia (s)	Concentração Mensurada (mg/g)
Controle	0	2,27
40	5	3,09
40	45	3,65
40	85	1,33
70	5	3,25
70	45	4,10
70	85	1,26
100	5	3,94
100	45	3,80
100	85	1,12

O tratamento com etanol 70% e mergulhia de 45 segundos apresentou maior teor de cumarina (4,10 mg/g) e o tratamento utilizando álcool absoluto com mergulhia de 85 segundos o menor rendimento (1,12 mg/g). O aumento no tempo de mergulhia de 45 para 85 segundos teve efeito negativo sobre o teor de cumarina para todas as concentrações de etanol avaliadas nesse estudo. As folhas tratadas com etanol 40% e tempo de mergulhia de 45 segundos apresentaram teor de cumarina (3,65 mg/g) superior ao das folhas mergulhadas nos tempos de 5 segundos (3,09 mg/g) e 85 segundos (1,33 mg/g). Esse decréscimo no teor de cumarina em função do aumento do tempo de mergulhia no solvente, também foi constatado nos experimentos com mergulhia em etanol 70%.

Os valores médios das triplicatas para o teor de cumarina (mg/g) obtidos para cada tratamento de secagem estão indicados na Figura 20.

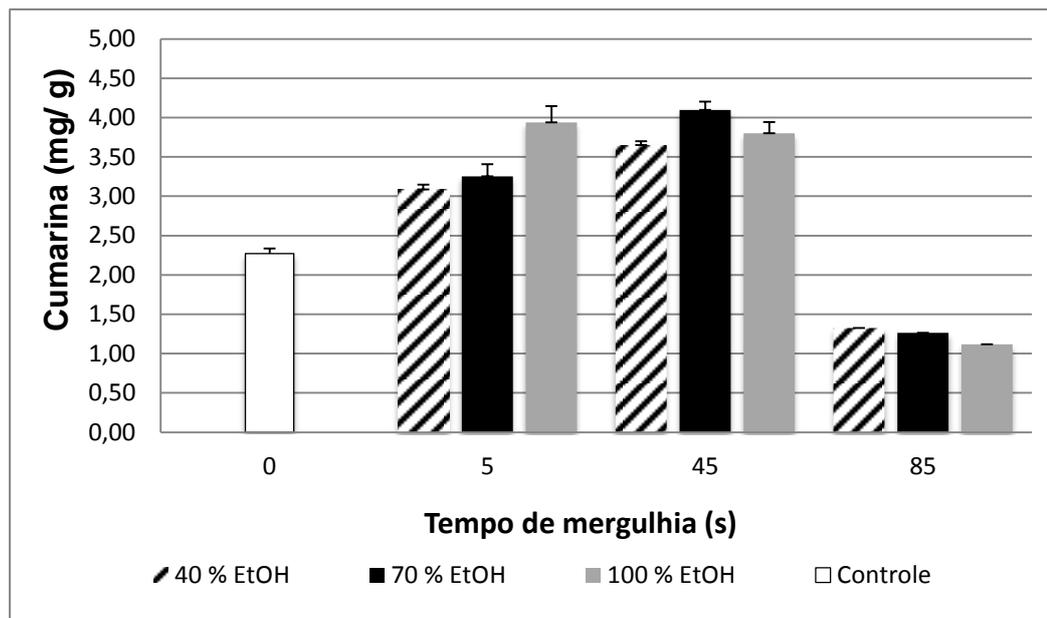


Figura 20: Teor de cumarina das folhas de guaco secas, utilizando diferentes tratamentos de secagem.

Nota-se que os extratos das folhas tratadas com etanol absoluto apresentaram menores quantidades de cumarina conforme aumento do tempo de mergulhia. No tratamento das folhas com álcool absoluto e tempo de mergulhia de 5 segundos, o teor de cumarina foi de 3,94 mg/g. Esse valor caiu para 3,80 e 1,12 mg/g com o aumento do tempo de mergulhia de 5 segundos para 45 e 85 segundos respectivamente. Essa redução pode ser justificada pelo fato de que o aumento do tempo de contato da droga vegetal com o solvente pode ter contribuído para extração desse constituinte químico.

A análise da influência estatisticamente significativa das variáveis foi verificada pelo Diagrama de Pareto apresentado na Figura 21.

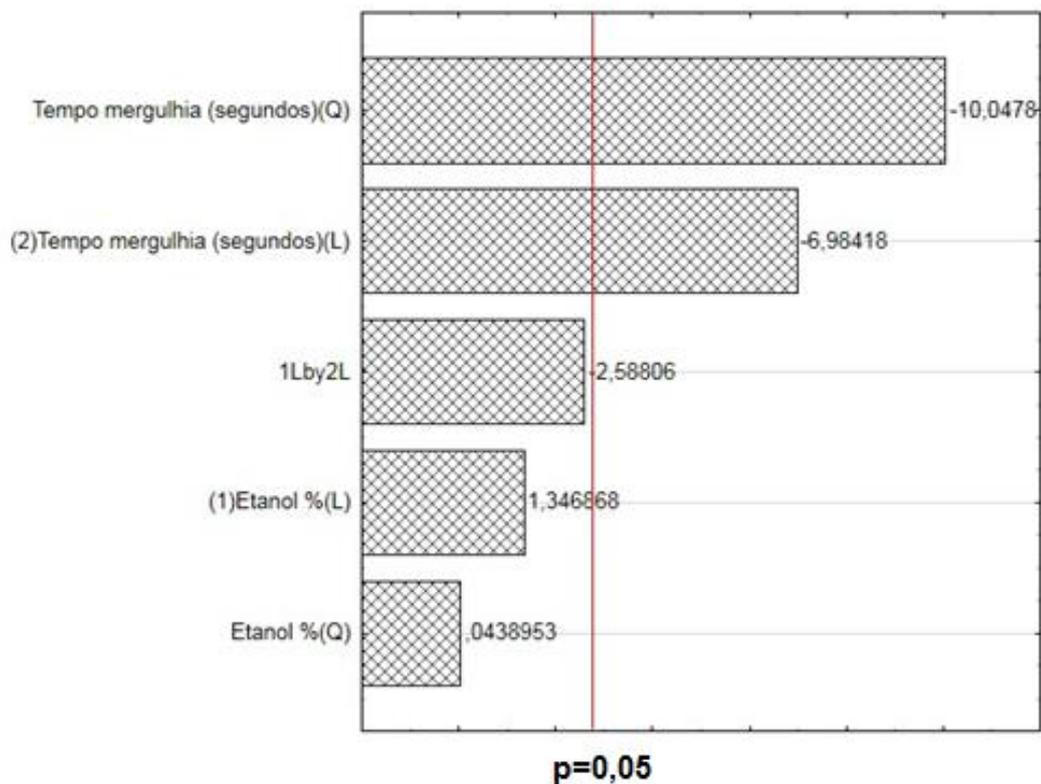


Figura 21: Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis no teor de cumarina.

As variáveis estudadas que estão à direita da reta vertical foram estatisticamente significativas. Apenas o tempo de mergulhia apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) no processo global da extração.

Uma vez avaliada as interações das variáveis e seus efeitos no teor de cumarina, realizou-se a otimização dos resultados por meio do método de superfície de resposta, empregando o planejamento experimental indicado na Tabela 3. Os gráficos foram elaborados utilizando o programa STATISTICA 12 e estão apresentados nas Figuras 22 e 23.

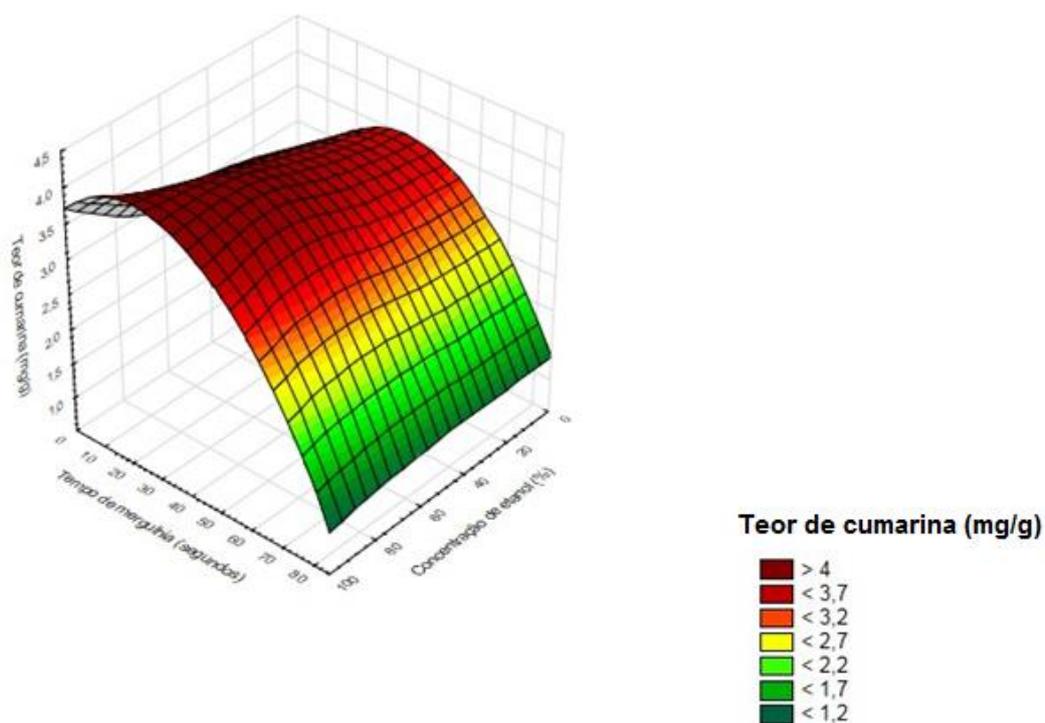


Figura 22: Gráfico de superfície de resposta para as condições estudadas e seus efeitos no teor de cumarina.

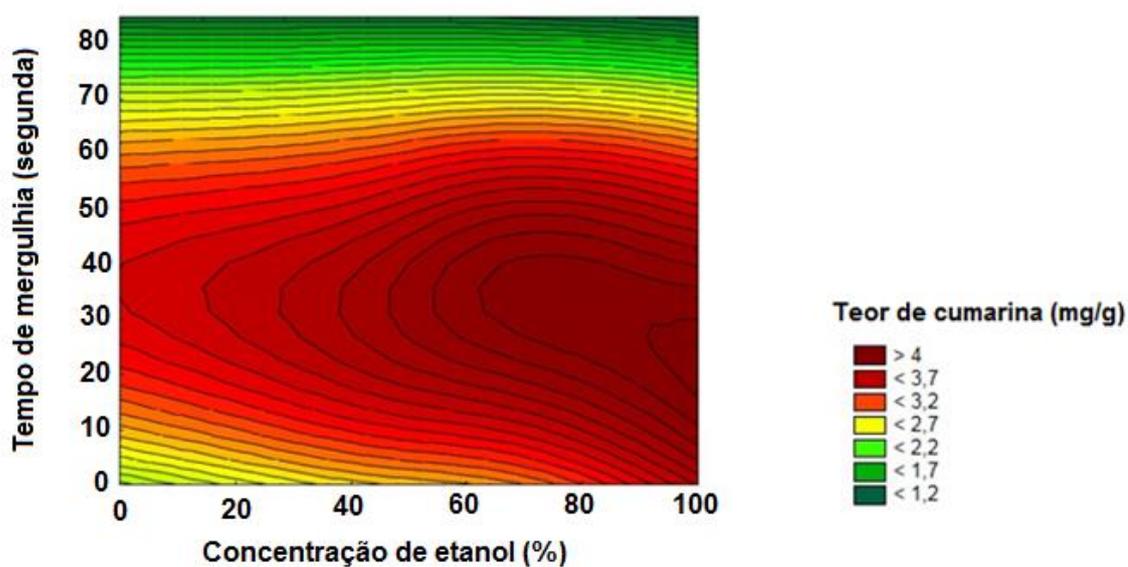


Figura 23: Gráfico da curva de contorno para as condições estudadas e seus efeitos na resposta (teor de cumarina).

As Figuras 22 e 23 mostram os gráficos de superfície de resposta e curva de contorno para as condições estudadas. O tempo de mergulhia teve grande influência no teor de cumarina. Nota-se que o ponto ótimo encontra-se entre a concentração de etanol de 60 e 100% e tempo de mergulhia de 20 a 40 segundos.

Assim, as condições ótimas para o teor de cumarina foram estimadas com base na “função de desejabilidade”. Essa técnica permite encontrar condições que forneçam o ponto ótimo com base na combinação de múltiplas respostas dentro de limites previamente estabelecidos. O valor ótimo encontrado correspondeu às condições experimentais utilizando etanol 70% com tempo de mergulhia de 33 segundos. Com base nisso, realizou-se o tratamento das folhas de guaco com as condições apresentadas pela função de desejabilidade. O teor de cumarina obtido para o tratamento no ponto ótimo foi de 4,71 mg/g. Esse valor foi superior a todos os resultados de experimentos prévios, demonstrando que a função desejabilidade foi aplicada corretamente. Ainda, em comparação com o controle, o teor de cumarina das folhas secas mais do que dobrou após tratamento nas condições ótimas de concentração de etanol e tempo de mergulhia.

Maiores rendimentos de cumarina também foram observados no trabalho de Silva, 2014 que estudou a influência do etanol na secagem de folhas de guaco e no rendimento de cumarina, assim como avaliou a estabilidade da cumarina em amostras secas durante o armazenamento em atmosfera acelerada e normal. As folhas submetidas ao processo de secagem usando etanol apresentaram os menores tempo de secagem e os maiores rendimentos de cumarina, tanto nos experimentos realizados no túnel quanto na estufa.

Braga e Silva (2010) realizaram estudos de secagem de fatias de abacaxi em atmosfera normal, atmosfera modificada com etanol (0,5 % v/v) e atmosfera normal com tratamento prévio da superfície do abacaxi com etanol. A evaporação de água foi mais intensa nas fatias tratadas com etanol em comparação com os outros métodos, apresentando menor tempo de secagem. Verificou-se também menor degradação da cor e maior retenção de vitamina C nas fatias com o tratamento.

A redução no tempo de secagem e o aumento do teor de ácido ascórbico com o uso do etanol foram igualmente constatados no trabalho de Santos e Silva (2008) que apuraram a influência da atmosfera modificada com etanol na secagem e retenção de ácido ascórbico em fatias de abacaxi. O experimento foi realizado em um secador de túnel, utilizando duas temperaturas (40 e 60 °C), sob atmosfera normal e modificada, até o teor de umidade atingir aproximadamente 27 % b.u. A presença de etanol na secagem a 40 °C promoveu uma evaporação mais intensa e maior retenção de ácido ascórbico, aproximadamente 8% a mais, quando comparada com o método convencional.

Vários estudos vêm mostrando as vantagens do emprego de tecnologias combinados aos métodos tradicionais de secagem na preservação da matéria prima vegetal. O uso de pré-tratamentos antes da secagem vem ganhando atenção por acelerar o processo de secagem, melhorar a qualidade final do produto seco e a estabilidade para seu armazenamento. Um dos tratamentos que pode ser utilizado é o tratamento osmótico que consiste em mergulhar a planta ou alimento em uma solução aquosa de glicerol, etanol, açúcar, sal para desidrata-la parcialmente (RATTI, 2009).

Neste trabalho foi possível verificar que a utilização do tratamento com etanol apresentou vários aspectos positivos. O primeiro está relacionado à maior remoção do conteúdo de umidade durante a secagem e conseqüente redução do tempo do procedimento. Esse fator pode apresentar benefícios no que diz respeito à redução de gastos de energia com equipamento e permitir que vários ciclos de secagem sejam realizados em um período menor de tempo menor, aumentando a produtividade. Além disso, por meio do ponto ótimo foi possível observar que não há a necessidade da utilização do álcool absoluto antes da secagem para obter o rendimento almejado do constituinte químico, o que representa redução nos custos com solvente.

Vale ressaltar que não existem na literatura estudos avaliando a influência de diferentes tempos de mergulhia no teor de substâncias ativas ou compostos voláteis. Foi constatado neste trabalho que tempos prolongados desse processo podem ter efeitos negativos no rendimento de compostos ativos e qualidade final do produto. Assim, fica evidente a necessidade de maiores estudos que verifiquem a aplicação do tratamento com etanol para outras espécies vegetais,

uma vez que esses experimentos podem gerar grande repercussão para a indústria e mercado farmacêuticos.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que estudos na área de processamento de plantas medicinais e aromáticas são fundamentais para a obtenção de produtos de qualidade, uma vez que a escolha do método de secagem é fundamental para minimizar a perda de substâncias ativas.

A secagem promoveu mudanças físicas e anatômicas importantes nas folhas de guaco com encolhimento e perda na colocação.

O modelo de Page apresentou ajuste apropriado para descrever a secagem das folhas de guaco. O uso do etanol influenciou na remoção do conteúdo de umidade durante a secagem, sendo maior nas folhas tratadas quando comparadas ao controle. Além disso, foi possível observar redução no tempo de secagem das folhas tratadas com etanol e maior teor de cumarina em relação ao controle. O valor ótimo encontrado correspondeu às condições experimentais utilizando etanol 70% e tempo de mergulho de 33 segundos, com teor de cumarina de 4,71 mg/g. Esse valor foi superior a todos os resultados prévios, sendo cerca de duas vezes maior em comparação ao controle. Com adaptações apropriadas, esses experimentos podem ser extrapolados para outras plantas medicinais e gerar grande repercussão para a indústria e mercado farmacêuticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIFISA. **ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DO SETOR DE FITOTERÁPICOS, SUPLEMENTO ALIMENTAR E DE PROMOÇÃO DA SAÚDE.** Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br>>. Acessado em: 22 mar. 2015.

AGUIRRE, J. M.; GASPARINO FILHO, J. **Desidratação de Frutas e Hortaliças.** Campinas: ITAL: p. 205, 2002.

ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 450 – 513, 2013.

ATHIÉ, I.; CASTRO, M. F. P. M.; GOMES, R. A. R.; VALENTINI, S. R. T. **Conservação de grãos.** Campinas: Fundação Cargill, p. 236, 1998.

BARBOSA, F. F.; MELO, E. C.; SANTOS, R. H. S.; ROCHA, R. P.; MARTINAZZO, A. P.; RADÜNZ, L. L.; GRACIA, L. M. N. Evaluation of mathematical models for prediction of thinlayer drying of brazilian lemon-scented verbena leaves (*Lippia alba* (MILL) N.E. BROWN). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 9, n. 1, p. 71–80, 2007.

BIGHETTI, A. E.; ANTÔNIO, M. A.; KOHN, L. K.; REHDER, V. L. G.; FOGLIO, M.; POSSENTI, A.; VILELA, L.; CARVALHO, J. E. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, v. 12, p. 72–77, 2005.

BRAGA, A. M. P. .; SILVA, M. A. **Effect of ethanol on the drying kinetics and on the quality of pineapple slices.** In Proceedings of the 17th International Drying Symposium – IDS. **Anais...**Magdeburg, Germany,: 2010

BRASIL. **Decreto n. 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Diário Oficial da União.** Brasília, 2006. Disponível em:

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm

Acessado em: 23 fev. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no 3.237, de 24 de dezembro de 2007. Aprova as normas de execução e de financiamento da assistência farmacêutica na atenção básica em saúde [Internet]. Diário Oficial da União.

Brasília, 2007. Disponível em:

http://dtr2004.saude.gov.br/dab/docs/legislacao/portaria_gm_3237_2008.pdf

Acessado em: 28 fev. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada n. 14, de 31 de março de 2010. Diário Oficial da União. Brasília - DF, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de

Atenção Básica; n. 31), 2012. Disponível em:

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_cab31.pdf Acessado em: 23 fev. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014 que determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. 2014. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/10f7288044703a8bbbf8fffe3a642e80/Guia+final+dicol+180614.pdf?MOD=AJPERES>>> Acessado em: 27 fev. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Poder executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 02 jun 2003. 2003.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 4. ed. São Paulo, 2005.

BRITO, M. R. M. **Avaliação dos efeitos de *Mikania glomerata* sobre o Sistema Nervoso Central**. 2012, 56f. Monografia (Conclusão de curso). Departamento de bioquímica e farmacologia curso de farmácia. Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2012.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; KOSCIUV, I.; MORAIS, T. B.; FERRARI, L. P. Contribuição ao estudo farmacognóstico de *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker (guaco), visando o controle de qualidade da matéria-prima. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 10, n. 2B, p. 545–552, 2009.

CARLESSO, V. O. **Secagem e armazenamento de sementes de mamão (*Carica papaya* L.)**. 2009, 132f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2009.

CASTRO, E. M. **Alterações anatômicas fisiológicas e fitoquímicas em *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento**. 2002, 221f. Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, 2002.

CAVARIANI, C. **Secagem estacionária de sementes de milho com Distribuição radial do fluxo de ar**. 1996, 64f. ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

CHENG, J. F.; CHEN, M.; WALLACE, D.; TITH, S.; ARRHENIUS, T.; KASHIWAGI, H.; ONO, Y.; ISHIKAWA, A.; SATO, H.; KOZONO, T.; SATO, H.; NADZAN, A.M. Discovery and structure-activity relationship of coumarin derivatives as TNF- α inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 2411–2415, 2004.

CONTIN, D. R. **Alterações anatômicas e fisiológicas em plantas de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker, sob diferentes condições luminosas e nutricionais**. 2009, 142f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009.

CORRÊA, J. L. G.; BRAGA, A. M. P.; HOCHHEIM, M.; SILVA, M. A. The Influence of Ethanol on the Convective Drying of Unripe, Ripe, and Overripe Bananas. **Drying Technology: An International Journal.**, v. 30, n. 8, p. 817–826, 2012.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 400 – 409, 2012.

DALPASQUALE, V. A. **Secagem de Grãos em Altas Temperaturas**. 1984, 29f. Viçosa:Centro Nacional de Treinamento em Armazenagem. 1984.

DANTAS, S. C. M. **Desidratação de polpas de frutas pelo método foam-mat**. 2010, 100f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Natal-RN, 2010.

DEDAVID, B. A. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores [recurso eletrônico]**. Porto Alegre: EDIPUCRS, p.60, 2007.

DIAS, L. G. **Estudo do processo de secagem em estufa e por microondas de compósitos cerâmicos de argila e resíduos de esteatito**. Dissertação (Mestrado), Departamento de Ciências Térmicas e dos Fluidos e Centro Fede, Universidade Federal DE São João del Rei, 2013.

DOYMAZ, I.; KIPCAK, A. S.; PISKIN, S. Characteristics of Thin-layer Infrared Drying of Green Bean. **Czech J. Food Sci**, v. 33, n. 1, p. 83–90, 2015.

DUARTE, M. R.; SIEBENROK, M. C. N.; EMPINOTTI, C. B. Anatomia comparada de espécies de arnica: *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. e *Chaptalia nutans* (L.) Pohl. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 193–201, 2007.

EIRAS, D. L. **Perda de matéria seca em grãos de milho submetidos a sistemas de secagem natural e artificial**. 2013, 60f. Dissertação (Mestrado em

Agronomia), Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu-SP, 2013.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia: na atenção primária à saúde**. São Paulo: p.147, 2001.

ETHUR, L. Z.; JOBIM, J. C.; RITTER, J. G.; OLIVEIRA, G.; TRINDADE, B.S. Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaqui – RS. **Rev. bras. plantas med.**, v. 13, n. 2, p. 121 – 128, 2011.

FERREIRA, L. F. D.; PIROZI, M. R.; RAMOS, A. M.; PEREIRA, J. A. M. Modelagem matemática da secagem em camada delgada de bagaço de uva fermentado. **Pesq. agropec. bras.**, v. 47, n. 7, p. 855–862, 2012.

FIERRO, I. M.; SILVA, A. C. B.; LOPES, C. S.; MOURA, R. S.; BARJA-FIDALGO, C. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 19–24, 1999.

GASPARETTO, J. C.; CAMPOS, F. R.; BUDEL, J. M.; PONTAROLO, R. *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, p. 627–640, 2010.

GONELI, A. L. D.; VIEIRA, M. C.; VILHASANTI, H. C. B.; GONÇALVES, A. A. Modelagem matemática e difusividade efetiva de folhas de aroeira durante a secagem. **Pesq. Agropec. Trop**, v. 44, n. 1, p. 5–64, 2014.

HATTORI, E. K.; FERREIRA, S. C.; FERNANDES, A. C.; OLIVEIRA, C. T.; RIVERA, V.; ROQUE, N.; BATISTA, J. A. N.; PIRANI, J. R.; PANERO, J. L.; NAKAJIMA, J. N.; VAN DEN BERG, C. O que as moléculas têm a nos contar sobre as subtribos e gêneros de Eupatorieae: um breve histórico sobre a classificação. **Anais do 64º Congresso Nacional de Botânica: botânica**

sempre viva e XXXIII ERBOT - Encontro Regional de Botânicos MG, BA e ES. Sociedade Botânica do Brasil. p. 224, 2013.

HOCHHEIM, M. R.; SILVA, M. A.; BRAGA, A. M. P. Estudo do encolhimento de abacaxi submetido à secagem em atmosfera modificada pela adição de etanol— parte 2. **Anais do XVIII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas.**, v. 18, p. 541, 2010.

HORNOK, L. **Primary Processing of Medicinal Plants** ed. C. J. W. & Sons Cultivation and processing of medicinal plants. **Anais...**1992

ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of Pharmaceutical for Human use. **Q2B-validation of Analytical procedure: methodology.** 1996.

ICH. **International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1),** 2005.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos.**, 2011.

KING, R. M.; ROBINSON, H. The genera of Eupatorieae (Asteraceae). Lawrence: Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. p. 581, 1987.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 30, n. 3, p. 241 – 248, 2009.

KOMPANY, E.; ALLAF, K.; BOUVIER, J. M.; GUIGON, P.; MAUREAUX, A.. Nouveau procédé de déshydratation des fruits et légumes à réhydratation instantanée. **Industries Alimentaires et Agricoles**, p. 1243–1248, 1990.

KUSTER, R. M. **Medicinal Plant Research in Africa Pharmacology and Chemistry.** 1. ed. Elsevier insights, 2013, 889 p.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009.

LEWIS, A.; OUGH, M. L.; LI, M., HINKHOUSE, M. M.; RITCHIE J. M.; SPITZ D. R.; CULLEN J. J. Treatment of Pancreatic Cancer Cells with Dicumarol Induces Cytotoxicity and Oxidative Stress. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 4550–4558, 2004.

LIMA, R. C. **Caracterização fitoquímica das folhas de guaco – Mikania glomerata por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e CCD (cromatografia em camada delgada)**. Anais do 19º Congresso de Iniciação Científica da UnB 10º Congresso de Iniciação Científica do DF. **Anais...Brasília**: 2013.

LOPES, F. J. **Estudo do fenômeno de encolhimento na secagem convectiva de abacaxi com aplicação de micro-ondas**. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. ed. 2. Nova Odessa. Plantarum, 2002, 512p.

LUCETTI, E. C. P. **Efeitos centrais da cumarina (1,2-benzopirona): estudo comportamental e neuroquímico em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos**. 2008, 88f. Dissertação (Mestrado), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MACEDO, E. V.; GEMAL, A. L. A produção de fitomedicamentos e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 90, n. 4, p. 290 – 297, 2009.

MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M. A.; OLIVEIRA, C. Z.; COUTO, L. B.; GOMES, O. A.; FRANCA, S. C.; SOARES, A. M.; PEREIRA, P. S. Antiophidian

properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **J. Ethnopharmacol**, v. 102, n. 3, p. 364–370, 2005.

MARCHESE, J. A.; FIGUEIRA, G. M. O uso de tecnologia pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 7, p. 86–96, 2005.

MARTINAZZO, A. P.; CORRÊA, P. C.; RESENDE, O.; MELO, E. C. Análise e descrição matemática da cinética de secagem de folhas de capim-limão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 3, p. 301–306, 2007.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2003, 220p.

MARTINS, L. R. R.; MOURÃO, K. M. S.; ALBIERO, A. L. M.; CORTEZ, A. G. D.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Estudo morfoanatômico preliminar do caule e da folha de *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze (Asteraceae-Heliantheae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 42–52, 2006.

MARTINS, P. M. **Influência de parâmetros de secagem e armazenamento sobre princípios ativos de interesse de duas espécies medicinais: guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) e calêndula (*Calendula officinalis* L.)**. 2005, 128f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF Campos dos Goytacazes – RJ, 2005.

MAYOR, L.; SERENO, A. M. Modelling shrinkage during convective drying of food materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 373–386, 2004.

MENEZES, R. F. Histórias de Medicamentos, Reações Adversas e Vigilância Sanitária: O Pioneirismo do Centro de Vigilância Sanitária de São Paulo - Parte I. **Sociedade Brasileira de Vigilância de Medicamentos**, n. 44/45, p. 2–21, ago. 2005.

MÖHLER, B. C. **Avaliação das características de secagem dos grãos de soja.**

2010, 35f. Trabalho de conclusão de curso, Departamento de Engenharia Química, Porto Alegre, 2010.

NASCIMENTO, V. R. G.; BIAGI, J. D.; OLIVEIRA, R. A. Modelagem matemática da secagem convectiva com radiação infravermelha de grãos de Moringa oleifera. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 7, p. 686–692, 2015.

OLIVEIRA, P. A. **Estudo fitoquímico comparativo entre espécies de *Mikania cordifolia* (L. F.) WILLD.** 2007, 126f. Tese (Doutorado), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.

PARCKERT, E. D. T. **Processamento de folhas de nim: inativação enzimática e secagem.** 2009, 79f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2009.

PARK, K. J.; ANTONIO, G. C.; OLIVEIRA, R. A.; PARK, K. J. B. Conceitos de processo e equipamentos de secagem. **CTEA – UNICAMP**, p. 121, 2007.

PARK, K. J. B.; PARK, K. J.; ALONSO, L. F. T.; CORNEJO, F. E. P.; DAL FABRO, I. M. Secagem: fundamentos e equações. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 121, 2007.

PARK, K.J.; YADO, M. K. M.; BROD, F. P. R. Estudo de secagem de pêra Bartlett (*Pyrus sp.*) em fatias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 288–292, 2001.

PAUL, R. K. .; JABBAR, A. .; RASHID, M. A. Antiulcer activity of *Mikania cordata*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 701–703, 2000.

PEREDA-ORDOÑEZ, J. A.; RODRIGUES, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGIILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S.

Componentes dos alimentos e processos. Tecnologia de alimentos. Porto Alegre - RS: editora Artmed, 2005.

PEREIRA, R. D.; VELOSO, J. A. F.; MOTA, H. F.; MOTA, B. C. F.; FREITAS, R. F.; ROYO, V. A. Estudo in vitro da atividade antifúngica do extrato de guaco (*Mikania glomerata*) contra *Candida albicans*. **Conexão ci.: r. cient. UNIFOR-MG**, v. 9, n. 1, p. 31–38, 2014.

RADÜNZ, L.L. Secagem de alecrim pimenta, guaco e hortelã-comum sobre diferentes temperaturas e sua influência na quantidade e qualidade dos princípios ativos. 2004, 90f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

RADÜNZ, L.L.; AMARAL, A.S.; MOSSI, A.J.; MELO, E.C.; ROCHA, R.P. Avaliação da cinética de secagem de carqueja. **Engenharia na Agricultura**, v.19, n.1, p.19-27, 2011.

RADÜNZ, L. L.; MELO, E. C.; BARBOSA, L. C. A.; ROCHA, R. P.; BERBERT, P. A. Rendimento extrativo de cumarina de folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) submetidas a diferentes temperaturas de secagem. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 14, n. 3, p. 453–457, 2012.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603 – 613, maio 2001.

RATTI, C. **Advances in food dehydration**. New York: Taylor & Group Francis, p.50, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBEIRO, E. F. B. **Contribuição ao estudo da flora amapaense: avaliação fitoquímica do extrato metanólico das sementes de *Vatairea guianensis* Aublet**. Tese (Pós-graduação em ciência da saúde), Departamento de Pós-

Graduação, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amapá, 2012.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; R., SILVA L.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quim. Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

RITTER, M. R.; MIOTTO, S. T. S. Micromorfologia da superfície do fruto de espécies de *Mikania Willd.* (Asteraceae) ocorrentes no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta bot. bras.**, v. 20, n. 1, p. 241–247, 2006.

ROCHA, F. A. G.; ARAÚJO, M. F. F.; COSTA, N. D. L.; SILVA, R. P. O uso terapêutico da flora na história mundial. **Holos**, v. 1, p. 49 – 61, 2015.

ROQUE, N. **Asteraceae : caracterização e morfologia floral**. EDUFBA, 2008, 73p.

SANTANA, L. C. L. R.; SILVA, O. A.; BRITO, M. R. M. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; GALVÃO, K. C. S.; MORAES, J. FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante, atividade antimicrobiana e antihelmíntica do extrato etanólico padronizado das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel. **Rev. Bras. Farm.**, v. 94, n. 2, p. 120–129, 2013.

SANTANA, A. C. M.; PEREIRA, G. S.; BOAVENTURAA, M. C.; UETENABAROA, A. P. T.; COSTA, L. C. B.; OLIVEIRA, R. A. Rupture of glandular trichomes in *Ocimum gratissimum* leaves influences the content of essential oil during the drying method. **Rev Bras Farmacogn**, v. 24, n. 2014, p. 524–530, 2014.

SANTOS, J. C. **Produção e qualidade do guaco (*Mikania laevigata* Schultz) cultivado em sistema agroecológico**. 2013, 100F. Dissertação (Mestrado) em Ciências Agrárias, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais. Montes Claros – MG, 2013.

SANTOS, P. H. S.; SILVA, M. A. **Preliminary study of ascorbic acid retention during drying of pineapple in ethanolic atmosphere.** In Proceedings of the 16th International Drying Symposium (IDS 2008). **Anais...**Hyderabad, India: 2008

SANTOS, R. L.; SANTOS, R. L.; GUIMARAES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 13, n. 4, p. 486–491, 2011.

SANTOS, S. C.; KRUEGER, C. L.; STEIL, A. A.; KREUGER, M. R.; BIAVATTI, M. W.; WISNIEWSKI, J. A. Characterisation of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. **Planta Med**, v. 72, n. 8, p. 679–684, 2006.

SCHMID, J.; AMRHEIN, N. Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. **Phytochemistry**, v. 39, n. 4, 1995.

SERRANO, R.; SILVA, G.; SILVA, O. Application of Light and Scanning Electron Microscopy in the Identification of Herbal Medicines. In: A MÉNDEZ-VILAS, J. D. **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education.** 4. ed. Formatex, 2010. p. 182–190.

SILVA, A. S. B. **Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória de *Mikania lindleyana* DC: Validação do uso na medicina popular.** 2011, 107f. Dissertação (Mestrado), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, 2011.

SILVA, C. K. F. **Estimação de Parâmetros de Secagem de Alimentos-Formulação de Luikov e uso da Transformada Integral Generalizada.** 2010, 127f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

SILVA, L. C. A. **Efeito da desidratação osmótica assistida por ultrassom no processo de secagem convectiva de abacaxi pérola.** 2010, 127f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

SILVA, M. G. **Cinética de secagem de hortaliças: Estudo preliminar**. 2014. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

SILVA, M. G. **Secagem de folhas de guaco (*Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker) com adição de etanol: efeito sobre o teor de cumarina**. 2014, 83f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

SOARES, M. R.; COSTA, S. S.; JANSEN, J. M.; SILVA, C. A.; LOPES, C. S.; BERNARDO-FILHO, M.; NASCIMENTO S, V.; CRIDDLE, D. N.; PORTELA, B. N.; RUBENICH, L. M.; ARAUJO, R. G.; CARVALHO, L. C. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **J Pharm Pharmacol.**, v. 54, n. 2, p. 249–256, 2002.

SOUSA, K. A.; RESENDE, O.; COSTA, L. M. Isotermas de desorção das sementes de nabo forrageiro obtidas pelos métodos dinâmico e estático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 2, p. 216–222, 2013.

SOUZA, G. S. **Desenvolvimento vegetativo, características anatômicas e fitoquímicas de plantas jovens de duas espécies de guaco, submetidas a diferentes condições de qualidade de radiação**. 2014, 118f. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, 2014.

SOUZA, G. S.; BORGES, K. C. A. S. Influência de fitorreguladores e do tipo de cultivo no crescimento de *Ocimum basilicum*. **Cadernos UniFOA**, n. 24, p. 57 – 63, 2014.

STANGARLIN, J. R. . et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18–46, 2011.

TADA, Y.; SHIKISHIMA, Y.; TAKAISHI, Y.; SHIBATA, H.; HIGUTI, T.; HONDA, G. ITO, M. ; TAKEDA, Y.; KODZHIMATOV, O. K.; ASHURMETOV. O.; OHMOTO, Y. Coumarins and γ -pyrone derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release. **Phytochemistry**, v. 59, n. 6, p. 649–654, 2002.

THUONG, P. T.; NA, M.; SU, N. D.; SEONG, R. S.; LEE, Y. M.; SOK, D. E.; BAE, K. Inhibitory effect of coumarins from *Weigela subsessilis* on low density lipoprotein oxidation. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 6, p. 1095–1097, 2005.

TOSATO, P. G. **Influência do etanol na secagem de maçã Fuji**. 2012, 158 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em engenharia de alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 2006.

VENABLE, D. L.; LEVIN, D. A. Morphological dispersal structures in relation to growth habit in the Compositae. **Plant Systematic Evolution.**, v. 143, p. 1–16, 1983.

VIEIRA, F. P. .; REDIGUIERI, C. F. **A Regulação de Medicamentos no Brasil**. 1ª ed ed. Porto Alegre: 2013, 72 p.

VITTO, L. A.; PETENATTI, E. M. Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. **Multequina**, v. 18, p. 18–115, 2009.

WHO. **WH**. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s14215e/s14215e.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2015.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da Moderna Química medicinal**. Universidade o Oeste de Santa Catarina, Argos, Chapecó: 2001, 713p.