



**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E
BIOTECNOLÓGICOS**

EMANOELY KAROLLINY GROELER

**ESTUDO DE PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE CUMARINA EM *Mikania
glomerata* (GUACO)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**TOLEDO
2020**

EMANOELY KAROLLINY GROELER

**ESTUDO DE PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE CUMARINA EM
Mikania glomerata (GUACO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Toledo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos.

Orientador: Professor Dr^o Ricardo Fiori Zara
Co-orientadora: Professora Dr^a Tatiana Shioji Tiuman

TOLEDO

2020

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca UTFPR Toledo
Bibliotecária Carla Rech Ribeiro - CRB 9/1685

G874 Groeler, Emanoely Karolliny
Estudo de processos de extração de cumarina em Mikania
glomerata (guaco) / Emanoely Karolliny Groeler. --
Toledo, PR : UTFPR, 2020.
44 f.: il.; 30 cm.

Texto em português
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica
Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Processos
Químicos e Biotecnológicos, Toledo, 2020.
Bibliografia: f. 41-44

1. Plantas medicinais - Uso terapêutico. 2. Extração
(Química. I. Zara, Ricardo Fiori. II. Tiunan, Tatiana Shioji.
III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa
de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos.
IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 660.6



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS TOLEDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E
BIOTECNOLÓGICOS



TERMO DE APROVAÇÃO

ESTUDO DE PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE CUMARINA EM *MIKANIA GLOMERATA* (GUACO)

Por

EMANOELY KAROLLINY GROELER

Esta dissertação foi apresentada às quatorze horas do dia dois de março de dois mil e vinte como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos, Linha de Processos Químicos e Biotecnológicos, no Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos – PPGQB, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo relacionados. Após deliberação, a banca Examinadora considerou o trabalho Aprovado.

Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara (Presidente – PPGQB)

Prof. Dr. Clayton Antunes Martin (Membro Interno – PPGQB)

Dr.^a Cristiane Loiva Reichert (Membro Externo – SUSTENTEC)

****A versão assinada encontra-se arquivada na Coordenação do PPGQB-TD***



AGRADECIMENTOS

Gratidão...

Não porque foi tudo perfeito nesses anos, mas foi do jeito que tinha que ser.

Ninguém disse que seria fácil, mas pessoas especiais fizeram esse momento valer a pena!

Principalmente Deus, pela sua companhia em todos os momentos e pela sua força em minha vida, por ser quem eu sou e por tudo que superei nesses anos!

A Maria, que nunca esteve ausente, nos momentos em que a angústia atormentava ela intercedeu!

A minha filha Maria Cecília, aos meus pais Rosani e Irineu, ao meu namorado Júlio César Forcelini que estiveram presentes em cada momento dessa jornada. Vocês são meu amparo e motivação! Sonharam comigo e juntos conseguimos essa conquista.

Aos meus mestres pelos ensinamentos.

Especialmente ao meu orientador Ricardo Fiori Zara pela dedicação, paciência e principalmente, pela amizade durante todo esse processo.

A professora Tatiana Shioji Tiuman por todas as contribuições ao projeto.

A Cristiane Loiva Reichert que me ajudou muito durante o mestrado, muito obrigada pelo apoio nas análises, pelos ensinamentos de HPLC, você merece o mundo e com certeza conquistará, pois é difícil encontrar pessoas como você! Minha eterna gratidão!

Ao professor Clayton Antunes Martin por todas as contribuições ao trabalho.

A UTFPR-*campus* Toledo, ao Laboratório Multiusuário da Central Analítica da UTFPR *campus* Toledo e a Unioeste- *campus* Cascavel pela disponibilização do local para a realização da pesquisa. A empresa Sustentec pelo apoio a pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tempo e % dos solventes da fase móvel utilizados nos métodos de extração da <i>M. glomerata</i>	20
Tabela 2 - Planejamento experimental da extração de guaco por maceração nas concentrações 50, 70 e 90% de álcool etílico e diferentes tempos de agitação	22
Tabela 3 - Planejamento experimental da extração por turbólise de cumarina e ácido o-cumárico com as variáveis não codificadas e codificadas	23
Tabela 4 - Planejamento experimental para a extração da cumarina e do ácido o-cumárico de <i>M. glomerata</i> utilizando enzima celulase com as variáveis não codificadas e codificadas	24
Tabela 5 - Teor de cumarina e ácido o-cumárico (g 100mL ⁻¹) em extratos de <i>M. glomerata</i> obtidos por maceração durante 4 e 7 dias em diferentes tempos de agitação.....	29
Tabela 6 - Teor de cumarina e de ácido o-cumárico (g 100mL ⁻¹) em amostras de <i>M. glomerata</i> (lote: GUP190201) em preparo de extratos por maceração durante 7 dias em diferentes tempos de agitação.....	30
Tabela 7 - Dados do teor (g mL ⁻¹) de cumarina e ácido o-cumárico em extratos de <i>M. glomerata</i> utilizando extração por turbólise em diferentes tempos de agitação.....	31
Tabela 8 - Valores ótimos previstos para tempo de turbólise e concentração de solvente para a extração de cumarina e do ácido o-cumárico em <i>M. glomerata</i>	34
Tabela 9 - Média dos extratos no valor considerado ótimo.....	35
Tabela 10 - Teor de cumarina e de ácido o-cumárico para a extração de <i>M. glomerata</i> utilizando enzima celulase	35
Tabela 11 - Valor considerado ótimo da extração de <i>M. glomerata</i> utilizando enzima celulase	38
Tabela 12 - Teor de cumarina da extração de <i>M. glomerata</i> utilizando enzima celulase do valor considerado ótimo	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (A) - Estrutura química da cumarina (B) Estrutura química do ácido o-cumárico	15
Figura 2 - Biossíntese da cumarina	15
Figura 3 - Estrutura química da celulose	18
Figura 4- Ação das celulasas sobre a molécula de celulose.....	18
Figura 5- Curva de calibração utilizada para determinação de cumarina em extratos de guaco.....	21
Figura 6- Curva de calibração utilizada para determinação de ácido o-cumárico em extratos de guaco	21
Figura 7 - Cromatograma da amostra de <i>M. glomerata</i> no comprimento de onda de 280nm.....	26
Figura 8 - Cromatograma dos padrões de cumarina e ácido o-cumárico no comprimento de onda de 280 nm	27
Figura 9 - Cromatograma da amostra de <i>M. glomerata</i> com adição de padrão de cumarina e ácido o-cumárico no comprimento de onda de 280nm.....	27
Figura 10 - Cromatograma do padrão de cumarina e de ácido o-cumárico, cromatograma da amostra de <i>M. glomerata</i> e o cromatograma da amostra <i>M. glomerata</i> contaminada com padrão.....	28
Figura 11- Diagrama de Pareto da cumarina para efeito da concentração e do tempo	32
Figura 12 - Diagrama de Pareto do ácido o-cumárico para efeito da concentração e do tempo	32
Figura 13 - Gráfico de superfície representação da influência do tempo e da concentração de solvente na extração de cumarina	33
Figura 14 - Gráfico de superfície representação da influência do tempo e da concentração de solvente na extração do ácido o-cumárico.....	34
Figura 15 - Diagrama de Pareto para a extração utilizando enzima da cumarina na amostra de <i>M. glomerata</i>	37
Figura 16 - Gráfico de superfície representação da influência do pH e da enzima na extração de cumarina	37
Figura 17 - Gráfico dos valores observados e dos valores previstos da extração de <i>M. glomerata</i> utilizando enzima celulase	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 Plantas Medicinais	12
3.2 Fitoterápicos	13
3.3 Guaco (<i>Mikania glomerata</i>)	14
3.4 Métodos de Extração	16
3.4.1 Extração por maceração	17
3.4.2 Extração por turbólise	17
3.4.3 Extração com enzima	18
4 METODOLOGIA	20
4.1 Material vegetal	20
4.2 Determinação da cumarina e do ácido o-cumárico	20
4.3 Extração da cumarina e do ácido o-cumárico por maceração	22
4.4 Identificação da cumarina e do ácido o-cumárico nas amostras	23
4.5 Extração da cumarina e do ácido o-cumárico por turbólise	23
4.6 Extração da cumarina e do ácido o-cumárico utilizando enzima	24
4.7 Análise estatística	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Identificação da cumarina e do ácido o-cumárico nas amostras	26
5.2 Extração da cumarina e do ácido o-cumárico por maceração	28
5.3 Extração da cumarina e do ácido o-cumárico por turbólise	31

5.4 Extração da cumarina e do ácido o-cumárico utilizando enzima	35
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS.....	41

RESUMO

A *Mikania glomerata* (guaco) é uma planta medicinal utilizada em medicamentos para tosse e problemas respiratórios. A principal substância ativa do guaco é a cumarina que pertence à família das benzopironas, porém há outros metabólitos secundários presentes na planta como o ácido o-cumárico. O objetivo deste trabalho foi apresentar meios para melhorar o processo extrativo e conseqüentemente melhorar a concentração de cumarina em extratos de guaco. Assim, realizou-se três métodos de extração (maceração, turbólise e utilizou-se enzima celulase) para extrair a cumarina e o ácido o-cumárico na amostra de *M. glomerata*. Após o processo de extração analisou-se por cromatografia líquida de alta eficiência os extratos utilizando um cromatógrafo (Thermo Scientific, Ultimate 3000 UHPLC+ focused), coluna C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), com fase móvel composta por metanol e água acidificada (ácido fosfórico 0,1%, v/v), acompanhando os seguintes comprimentos de onda: 220 nm, 254 nm, 280 nm e 340 nm, em seguida efetuou-se análise estatística dos dados utilizando o programa Statistica versão 10. Portanto, ao comparar os três métodos de extração realizados, o método utilizando enzima celulase foi o mais eficiente, no qual apresentou 97% de recuperação de cumarina na amostra, seguido do método por turbólise sendo a porcentagem de recuperação de 74,4%, com isso a extração da cumarina presente na *M. glomerata* pode ser otimizado com a utilização de enzimas por ser mais rápido e eficiente.

Palavras-chave: Fitoterápico; Ácido o-cumárico; Maceração; Turbólise; Enzima.

ABSTRACT

Mikania glomerata (guaco) is a medicinal plant used in medications for cough and respiratory illnesses. The main active substance present in guaco is coumarin, which belongs to the benzopyrone group, although there are other secondary metabolites present in the plant, such as o-Coumaric acid. The objective of this study was to present means to improve the extraction process and, consequently, to improve the concentration of coumarin in guaco extracts. Thus, three extraction methods (maceration, turbolysis and through cellulase enzyme) were used to extract coumarin and o-Coumaric acid of *M. glomerata* samples. After the extraction process, the extracts were analyzed by high-performance liquid chromatography analyzed a chromatograph (Thermo Scientific, Ultimate 3000 UHPLC + focused), column C18 (250 mm x 4.6 mm x 5 µm), with a mobile phase composed of methanol and acidified water (0.1% phosphoric acid, v / v), with the following wavelengths: 220 nm, 254 nm, 280 nm and 340 nm, and the data statistical analysis was performed using the Statistica program, version 10. Therefore, when comparing the three extraction methods employed, the method using cellulase enzyme was the most efficient, in which it presented 97% of coumarin recovery in the sample, followed by the turbolysis process, the recovery percentage being 74.4%, thus the extraction of coumarin present in *M. glomerata* can be optimized with the use of enzymes, as it is a faster and more efficient process.

Keywords: Herbal Medicine; O-Coumaric acid; Maceration; Turbolysis; Enzyme.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades vegetais do mundo (ZENI et al., 2017). Assim, vários estudos são realizados para obter informações sobre as plantas com atividades terapêuticas, com isso, permitem o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos conhecidos por serem seguros e eficazes (BRUNING et al., 2012).

Para ampliar o acesso a esses medicamentos, o Sistema Único de Saúde (SUS), disponibiliza fitoterápicos e plantas medicinais para alguns tratamentos. Dentre as plantas disponibilizadas esta a *Mikania glomerata* Spreng. pertencente à família Asteracea, conhecida popularmente pelo nome de Guaco (BRASIL, 2015).

A *M. glomerata* é empregada em atividade terapêutica no trato respiratório, anti-inflamatória, antialérgica, antioxidante e antimicrobiana (SILVA; OWITI; BARBOSA, 2018). Os efeitos farmacológicos são atribuídos a alguns dos seus principais metabólitos secundários, tais como cumarina, ácido o-cumárico e ácido caurenóico (GASPARETTO et al., 2015).

Apesar da comprovação dos efeitos farmacológicos, para obtenção de um produto fitoterápico de qualidade, várias etapas precisam ser desenvolvidas, entre elas, a otimização do processo extrativo, a qualidade do material vegetal, bem como a quantidade de metabólitos secundários presentes na planta (TEIXEIRA, 2017).

Assim, a extração é um dos processos mais utilizados para obtenção de compostos bioativos, onde um solvente age na estrutura celular do vegetal, retirando o composto de interesse. Entre os métodos mais comuns de extração, estão a maceração (extração convencional) e as metodologias consideradas como não convencionais como a utilização de enzimas e turbólise (MEREGALLI, 2017).

Enquanto as extrações convencionais utilizam um maior volume de solvente e tempo para a obtenção de resultados, as metodologias não convencionais vêm se mostrando mais eficazes, reduzindo estes parâmetros. Entretanto, os custos destes processos ainda são altos, o que pode em muitos casos tornar o custo-benefício inviável (MEREGALLI, 2017).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho é avaliar meios para melhorar o processo extrativo e conseqüentemente aumentar a quantidade de cumarina e ácido o-cumárico em extratos de guaco.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar diferentes processos extrativos da *M. glomerata* e otimizar o processo de extração de cumarina e ácido o-cumárico a partir do material seco.

2.2 Objetivos específicos

- Utilizar diferentes métodos de extração para obter extratos hidroalcoólicos de guaco;
 - Realizar a extração por maceração: extração durante 4 e 7 dias, com agitação por 30, 60, 90 e 120 min (1 vez ao dia);
 - Realizar a extração por turbólise de acordo com o planejamento fatorial nos tempos 1, 3 e 5 min;
 - Realizar a extração utilizando enzima conforme planejamento fatorial: extração com diferentes soluções tampões nos pHs (5, 6 e 7), temperaturas (30, 45 e 60°C), tempo (30, 60 e 90 min) e quantidade de enzimas celulase (1, 2 e 3 U mg⁻¹)
- Quantificar a cumarina e o ácido o-cumárico nos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Realizar análise estatística dos dados;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Plantas Medicinais

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define que planta medicinal é todo e qualquer vegetal com uma ou mais estruturas, que possui substâncias que podem ser usadas para fins terapêuticos ou que sejam iniciadores ou precursores de fármacos semissintéticos (OMS, 2002).

Plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade. Para serem utilizadas é preciso ter alguns conhecimentos a respeito, como onde colhê-las, como prepará-las e as suas verdadeiras funções (SILVA et al., 2017).

Quando a planta é colhida, submetida a processos como a secagem e apresentada na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada, é conhecida como droga vegetal (BRASIL, 2013).

As plantas medicinais tem ocupado o espaço cada vez maior na terapêutica de patologias, e isto é indiscutivelmente devido a sua eficácia e, sobretudo, pelo menor número de efeitos colaterais e contraindicações em relação a tratamentos farmacológicos convencionais (SOUZA et al., 2018).

Contudo, um dos fundamentais problemas da utilização é assegurar que são livres de reações adversas e efeitos tóxicos, pois diversas plantas medicinais têm substâncias ofensivas e por isso devem ser utilizadas com cuidado, observando os riscos toxicológicos (VEIGA et al., 2005).

A toxicidade de medicamentos preparados com plantas pode parecer comum, quando associada com os tratamentos convencionais, porém é um problema de saúde pública. A identificação incorreta das espécies e uso diferente da forma tradicional pode ser perigosa, levando a superdose e reações indesejadas (OMS, 2002).

Assim, é necessário realizar a padronização para que haja a quantidade necessária dos constituintes ativos da planta, de tal modo que seja controlada a quantidade de constituintes tóxicos. Dessa forma, a padronização torna-se essencial para garantir a qualidade do produto originado da planta (MACHADO, 2011).

Além disso, deve-se levar em consideração a concentração e dosagem dos constituintes químicos nos produtos originados da planta. Tais constituintes quando

ingeridos em doses excessivas, podem provocar efeitos adversos assim como os medicamentos convencionais. Por outro lado, baixas doses podem não ter efeito terapêutico (MACHADO, 2011).

3.2 Fitoterápicos

Com o passar dos anos e a evolução da tecnologia e das indústrias farmacêuticas, as plantas medicinais passaram a serem industrializadas para se obter um medicamento. Resulta-se desse processo de industrialização o surgimento do fitoterápico, que são medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente como fonte de matéria prima partes de vegetal ou o próprio vegetal (SILVA, et al., 2017).

Assim, a fitoterapia é altamente difundida no mundo todo, o reconhecimento de seu valor como recurso clínico, farmacêutico e econômico já levou muitos países a adotar a prática como política pública de saúde (BARRETO, 2011).

Deste modo, a fitoterapia vem sendo inserida no SUS, como forma de diminuir o impacto dos gastos com os medicamentos alopáticos. Como resultado obtêm-se uma diminuição dos custos, sendo a fitoterapia, vista como um método natural preventivo, conservador, regenerador e curativo de doenças (BRASIL, 2011).

A sua eficácia e segurança são comprovadas através de relatos etnofarmacológicos de uso, documentações tecnocientíficas, ou seja, são os “estudos de validação”. Eles buscam a aprovação do efeito farmacológico e da ausência de toxicidade da planta (BRASIL, 2010).

A Anvisa, por meio da Resolução IN 02/2014, publicou uma lista de fitoterápicos de registro simplificado e buscou estabelecer a padronização de marcadores químicos para diversas plantas e limite diário para seu uso. Entende-se esta preocupação como etapa fundamental para assegurar o uso e garantir eficácia ao fitoterápico (BRASIL, 2014).

Pois mesmo com as inúmeras vantagens e o fato de ser produzido de matéria natural, o uso de fitoterápicos e plantas medicinais podem desencadear reações adversas. No caso dos fitoterápicos podendo ser intrínsecas ou extrínsecas (SILVA et al., 2017).

As intrínsecas estão relacionadas a própria constituição química do medicamento, que podem gerar toxicidade, overdose, interação com outros

fármacos. Já as extrínsecas estão relacionadas a deficiência na fabricação, que podem ocorrer por identificação incorreta da planta, levando a erro de medicação e contaminação por praguicidas (SILVA et al., 2017).

3.3 Guaco (*Mikania glomerata*)

As plantas do gênero *Mikania* foram caracterizadas por Willdenow no ano de 1804, ganhando esse nome em consideração ao professor Joseph Gottfried Mikan. Para este gênero são mencionados cerca de 450 espécies espalhadas pelas regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América do Sul (COTIN, 2009).

M. glomerata e *M. laevigata* são plantas naturais da Mata Atlântica, nomeadas usualmente por *guaco*, *guaco-liso*, *guaco-de-cheiro*, *erva-de-serpente*, *guape*, *erva-de-cobra*, *coração-de-Jesus*, *erva-de-sapo*, *guaco-selvagem* e *guaco-trepador* (LORENZI; MATOS, 2008).

Estas duas espécies são confundidas por exibirem similaridade morfológica, composição química e usos medicinais muito parecidos. A principal diferença é o período de floração. Em setembro acontece a floração da *M. laevigata*, diferente da *M. glomerata*, que ocorre no mês de janeiro (NAPIMOGA; YATSUDA, 2010).

As folhas da espécie são muito usadas na medicina popular para o tratamento de várias doenças, como asma, cicatrizantes, anti-reumáticas e antiofídicas devido as suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e analgésicas (CZELSNIAK et al., 2012).

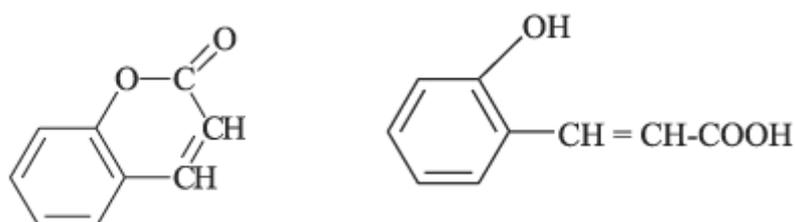
Com relação à composição química da *M. glomerata*, a espécie é rica em compostos cumarínicos, triterpenos/esteróides e heterosídeos flavônicos, além dos componentes voláteis como os óleos essenciais, estigmasterol e taninos hidrolisáveis (CZELSNIAK et al., 2012).

O metabólito secundário majoritário é a cumarina, que é considerada também o marcador químico da *M. glomerata*. As cumarinas são da família das benzopironas e estão presentes em vários compostos biologicamente ativos, apresentando diversas atividades biológicas e caracteriza o odor fragrante e aromático da espécie (KATSORI; HADJIPAVLOU, 2014).

A cumarina é uma lactona do ácido o-cumárico ou ácido hidroxicinâmicos (Figura 1(B)), sendo formada a partir da lactonização por ação enzimática e pelo

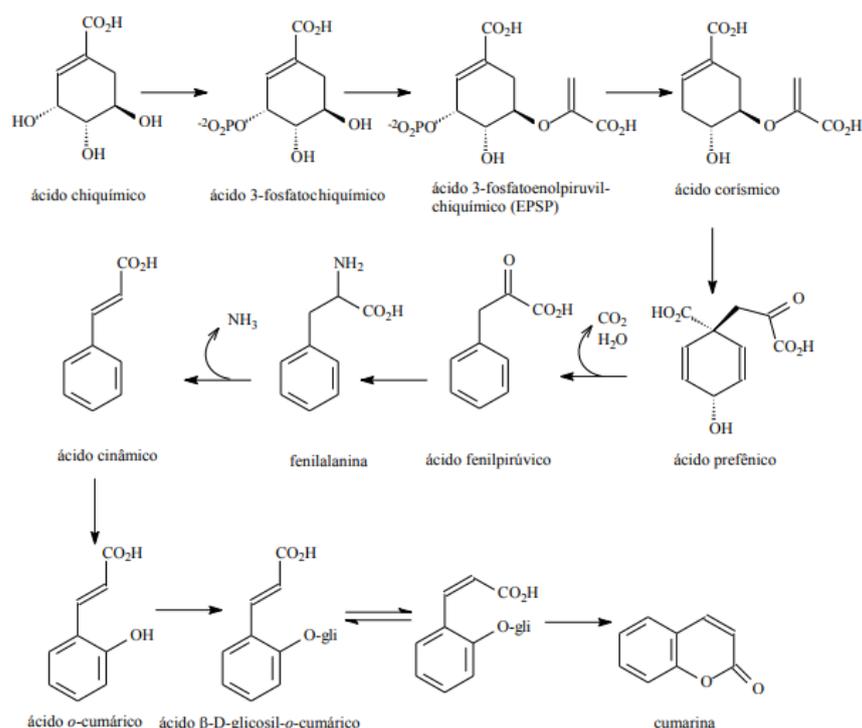
calor, sendo solúveis nos álcoois e nos solventes orgânicos (Figura 2) (CUNHA, 2009).

Figura 1 (A) - Estrutura química da cumarina (B) Estrutura química do ácido o-cumárico



Fonte: (RAMALHO; JORGE, 2006)

Figura 2 - Biossíntese da cumarina



Fonte: CZELISNIAK (2012)

Além da cumarina e do ácido o-cumárico, a *M. glomerata* possui diversos compostos químicos, dentre eles o lupeol, ácido α -isobutiriloxi-caur-16-em-19-oico, sesquiterpenos, friedelina, taninos hidrolisáveis, estigmasterol, saponinas e flavonoides (CZELISNIAK et al., 2012).

3.4 Métodos de Extração

Sabendo das diversas características que as plantas vêm a oferecer, como as propriedades medicinais, os métodos extrativos são responsáveis por obter os metabólitos ativos para as determinadas formas terapêuticas. A maneira como ocorre essa extração dos metabólitos secundários da planta influencia o potencial farmacológico e a composição química (CARVALHO, 2019).

A extração é uma operação unitária que envolve transferência de massa e objetiva, basicamente, a separação de compostos de interesse de uma matriz, seja ela sólida ou líquida através de processos químicos, físicos e/ou mecânicos (VIEIRA, 2015).

A escolha do método de extração está vinculada à estrutura e composição da matriz, por isso é fundamental o conhecimento das propriedades dos compostos de interesse e seu comportamento frente à diferentes solventes, quando estes são empregados (KOTOVICZ, 2014).

Alguns parâmetros podem influenciar a qualidade do extrato, como o órgão da planta utilizada, o solvente empregado e o procedimento da extração (TIWARI et al., 2011). Também é ideal que o processo de extração seja econômico, assim alguns fatores devem ser avaliados antes da inicialização do mesmo:

- A matéria-prima deve ser feita de forma que o extrato consiga ser dissolvido pelo solvente em pouco tempo;
- Dificilmente é possível escolher o solvente ideal, mas algumas características devem ser atentamente analisadas para que o processo seja viável (PINELO et al. 2004). O solvente deve ser escolhido pela seletividade, tensão interfacial, viscosidade, estabilidade, reatividade, toxicidade e custos.
- Altas temperaturas são interessantes, pois geram um aumento da solubilidade do soluto no solvente, porém podem resultar na degradação de compostos termo sensíveis;
- A capacidade que as substâncias possuem de se misturar depende da composição e da posição do soluto no material sólido;
- A umidade da planta, pois a água pode “disputar” com o solvente pela dissolução do soluto comprometendo a taxa de transferência de massa.

Deste modo, novas técnicas estão sendo desenvolvidas com o intuito de diminuir o tempo de extração, o consumo de solventes e ainda melhorar o

rendimento e qualidade do extrato. Entre estas, pode-se citar maceração, turbólise, com o auxílio de enzimas e ainda a utilização de solventes menos agressivos (BARBA et al., 2016; BESSA et al., 2017).

3.4.1 Extração por Maceração

A maceração é uma técnica de extração a frio em que a parte da planta utilizada e o solvente são colocados em um recipiente fechado e permanecem em temperatura ambiente durante um período prolongado, sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator (MEREGLI, 2017).

No início do processo o solvente entra nos capilares da matéria-prima e dissolve o extrato produzindo uma solução de alta concentração. Por causa da difusão uma mudança da concentração entre a solução no material da extração e a solução que cerca as partículas contínuas ocorre. Ao final do processo da extração uma determinada quantidade da solução (que consiste de uma mistura de solvente e soluto extraído) é retida ainda nas partículas contínuas. Esta é a razão pela qual, praticamente nenhuma extração completa é possível (GAMSE, 2002).

As vantagens deste processo estão no baixo custo operacional e de capital, pois utiliza geralmente equipamentos simples e temperaturas próximas à ambiente (KOTOVICZ, 2014). Entretanto, possuem desvantagens como elevados tempos para se alcançar a concentração máxima do composto de interesse, grande demanda de solvente e degradação térmica devido ao tempo elevado de processo (WANG; WELLER, 2006).

3.4.2 Extração por Turbólise

A turboextração, ao contrário da maceração é um processo de extração físico que facilita o rompimento da parede celular das células vegetais favorecendo a rápida extração de metabólitos secundários sensíveis a solventes orgânicos apolares (SERRANO et al., 2013).

Assim, essa técnica é baseada na extração com agitação e redução simultânea do tamanho de partícula por meio da aplicação de uma força de cisalhamento que promove a ruptura das células vegetais. A ruptura das células vegetais leva a dissolução das substâncias ativas no meio extrator, esgotando,

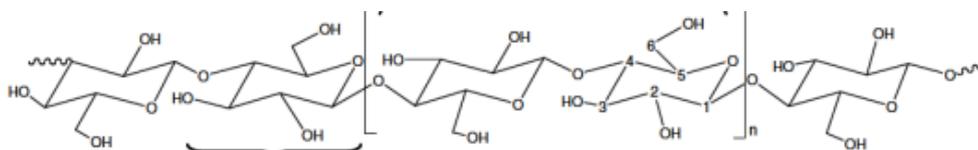
assim, em questão de segundos, quase que completamente a droga vegetal (MARTINS et al., 2017).

3.4.3 Extração com Enzima

De acordo com Azmir et al. (2013), a utilização de enzimas no processo de extração libera os compostos da planta e aumenta o rendimento do processo. Estas enzimas específicas como as celulases, amilases e pectinases auxiliam na extração pois realizam a hidrólise da parede celular, liberando os compostos presentes.

As enzimas celulases são responsáveis pela degradação da celulose, principal composto presente nas células vegetais. A celulose (Figura 3) é um polissacarídeo formado por várias unidades de glicose unidas entre si através de ligações químicas. As celulases realizam a quebra das ligações químicas existentes entre as unidades de glicose que formam a celulose (ZANCHETTA, 2013).

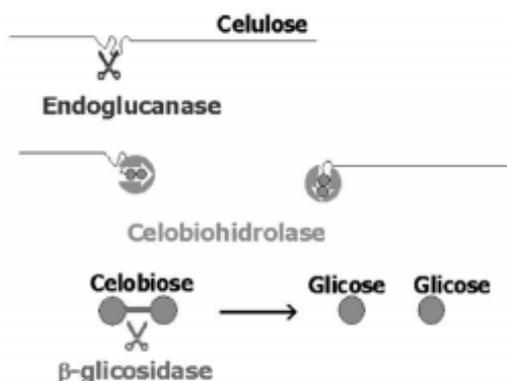
Figura 3 - Estrutura química da celulose



Fonte: (HENRIQUE, 2014)

Três enzimas fazem parte do grupo das celulases, as quais recebem os nomes de endoglucanases, exoglucanases e beta-glicosidases (Figura 4).

Figura 4- Ação das celulases sobre a molécula de celulose



Fonte: (OGEDA; PETRI, 2010).

A quantidade da enzima celulase é um fator importante no processo. Quando se aumenta a concentração de enzima aumenta-se o rendimento da extração, porém compromete-se a viabilidade econômica do processo, uma vez que o custo da enzima ainda é um fator limitante desta tecnologia (LAROZE; SOTO; ZUNIGA, 2010).

Além da escolha mais adequada do tipo e da concentração da enzima a ser utilizada, deve-se considerar alguns parâmetros como pH, temperatura, tamanho das partículas, agitação, proporção sólido/líquido e tempo de hidrólise pois as condições utilizadas no processo influenciam o rendimento da extração (XU; CHANG, 2014).

4 METODOLOGIA

4.1 Material vegetal

As folhas secas e rasuradas de *M. glomerata* (lote: GUP190201 e GUP180701) foram fornecidas pela empresa Sustentec, as mesmas foram armazenadas em local seco e protegidas da luz.

De acordo com o certificado de análise o lote GUP190201 apresenta 0,4% de cumarina e 5,52% de umidade e o GUP180701 0,6% de cumarina e 3,74% de umidade. Os dados referentes ao ácido o-cumárico não são fornecidos pelo certificado.

4.2 Determinação da cumarina e do ácido o-cumárico

Para determinar o teor de cumarina e do ácido o-cumárico utilizou-se como base a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 5ªed., 2010. As análises foram realizadas com cromatógrafo (Thermo Scientific, Ultimate 3000 UHPLC⁺ focused) acoplado ao detector de UV-Vis (VWD-3400RS), bomba quartenária (LPG-3400SD), forno (TCC-3400RS) e sistema de injeção manual (20µL). Foram acompanhados os seguintes comprimentos de onda: 220 nm, 254 nm, 280 nm e 340 nm, coluna C18, Zorbax Eclipse XDB (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), temperatura de 25°C, com fase móvel composta por metanol (grau CLAE, J. T. Baker) e água acidificada (ácido fosfórico 0,1%, v/v) pH próximo de 2, em um fluxo de 1,2 mL min⁻¹ (Tabela 1).

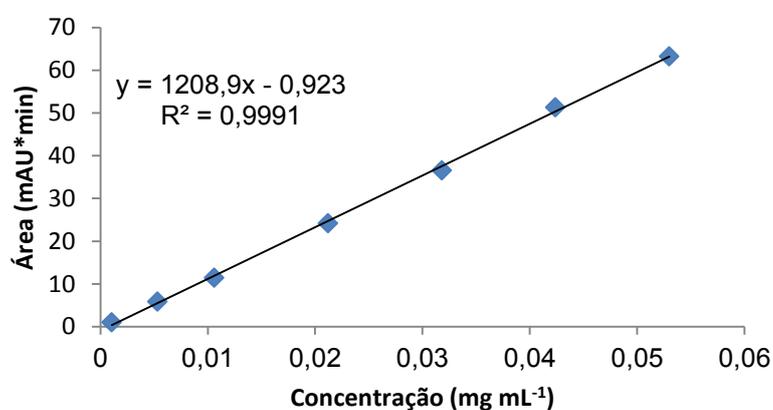
Tabela 1 - Tempo e % dos solventes da fase móvel utilizados nos métodos de extração da *M. glomerata*

Tempo (min)	MeOH (%)	Água acidificada (%)
0	47	53
10	47	53
11	95	5
20	95	5
22	47	53
30	47	53

Fonte: A autora

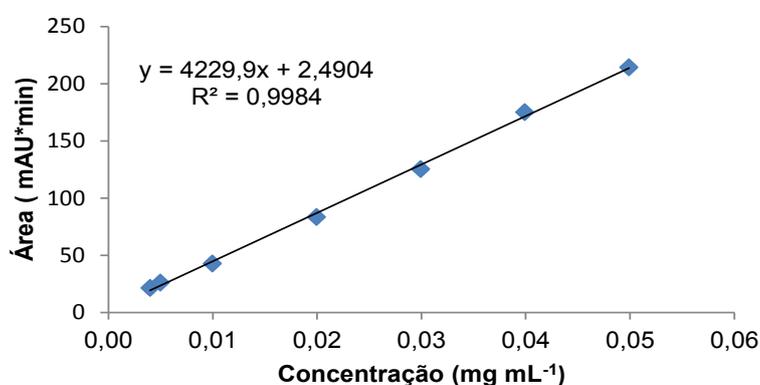
Para a análise quantitativa da cumarina e do ácido o-cumárico utilizou-se o método padrão externo, sendo o tempo de retenção da cumarina \cong 6 min e do ácido o-cumárico \cong 7 min. Este método permitiu comparar a área da cumarina e do ácido o-cumárico obtido nos cromatogramas das amostras de guaco com as áreas obtidas pelas soluções do padrão de cumarina, PhytoLab, lote: 2542 de concentrações conhecidas, iguais a (0,001-0,05 mg mL⁻¹) (Figura 5) e do ácido o-cumárico PhytoLab, lote: 4341 de concentrações conhecidas, iguais a (0,004-0,05 mg mL⁻¹) (Figura 6).

Figura 5- Curva de calibração utilizada para determinação de cumarina em extratos de guaco



Fonte: A autora

Figura 6- Curva de calibração utilizada para determinação de ácido o-cumárico em extratos de guaco



Fonte: A autora

4.3 Extração da cumarina e do ácido o-cumárico por maceração

Pesou-se 5 g de *M. glomerata* (lote: GUP180701) e preparou-se extratos de 25 mL de álcool etílico nas concentrações conforme apresentado na Tabela 2. Colocou-se os extratos em uma mesa agitadora, à temperatura ambiente e submetidos à agitação 120 rpm com tempo determinado (Tabela 2), durante o período de 4 e 7 dias, protegidos da luz, adaptado da Farmacopéia Brasileira 5ªed. (2010).

Tabela 2 - Planejamento experimental da extração de guaco por maceração nas concentrações 50, 70 e 90% de álcool etílico e diferentes tempos de agitação

Concentração(%)	Tempo(min)
50	60
50	90
50	120
70	30
70	60
70	90
70	120
90	30
90	60
90	90
90	120

Fonte: A autora

Após agitação, filtrou-se o material em papel filtro e transferiu-se a amostra para um balão de 10 mL, sendo 2 mL de extrato, 1 mL de água mili-Q e completando-se com metanol. Em seguida filtrou-se em seringa PVDF (25 mm x 0,45 µm) e analisou-se o extrato diretamente por cromatografia líquida de alta eficiência.

Realizou-se o mesmo procedimento experimental durante o período de 7 dias com a amostra de *M. glomerata* (lote: GUP190201).

4.4 Identificação da cumarina e do ácido o-cumárico nas amostras

Preparou-se uma amostra da extração por maceração em um balão de 10 mL, sendo 2 mL de extrato, 1 mL de água mili-Q e completou-se com metanol. Em seguida filtrou-se com filtro de seringa PVDF (25 mm x 0,45 µm) a amostra e analisou-se o extrato diretamente por cromatografia líquida de alta eficiência. Com a mesma amostra preparou-se um extrato com adição do padrão de cumarina e ácido o-cumárico e analisou-se por cromatografia líquida de alta eficiência. Após, analisou-se apenas o padrão de cumarina e de ácido o-cumárico.

4.5 Extração da cumarina e do ácido o-cumárico por turbólise

Pesou-se 5 g de *M. glomerata* (lote: GUP190201) e preparou-se extratos de 25 mL por trituração utilizando o equipamento Turrtec modelo: Tecnal TE-102, submetido à agitação 18.000 rpm conforme o planejamento experimental estatístico apresentado na Tabela 3. Utilizou-se o *software* Statistica versão 10 e os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 3 - Planejamento experimental da extração por turbólise de cumarina e ácido o-cumárico com as variáveis não codificadas e codificadas

Tempo (min)	Concentração (%)
1 (-1)	50 (-1)
3 (0)	50 (-1)
5 (1)	50 (-1)
1 (-1)	70 (0)
3 (0)	70 (0)
5 (1)	70 (0)
1 (-1)	90 (1)
3 (0)	90 (1)
5 (1)	90 (1)

Fonte: A autora

Após agitação filtrou-se o material em papel filtro e transferiu-se a amostra para um balão de 10 mL, sendo 2 mL de extrato, 1 mL de água mili-Q e completando-se com metanol. Em seguida filtrou-se em seringa PVDF (25 mm x 0,45 µm) e analisou-se o extrato diretamente por cromatografia líquida de alta eficiência.

4.6 Extração da cumarina e do ácido o-cumárico utilizando enzima

Pesou-se 1 g de *M. glomerata* (lote: GUP190201) e preparou-se extratos com 10 mL de solução tampão. Os valores de pH da solução tampão, a quantidade da enzima celulase, tempo de agitação e a temperatura utilizados foram de acordo com o planejamento experimental apresentado na Tabela 4, obtidos com o *software* Statistica versão 10.

Tabela 4-Planejamento experimental para a extração da cumarina e do ácido o-cumárico de *M. glomerata* utilizando enzima celulase com as variáveis não codificadas e codificadas

pH	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Enzimas(U mg ⁻¹)
5 (-1)	30 (-1)	30 (-1)	3 (1)
5 (-1)	30 (-1)	30 (-1)	1 (-1)
5 (-1)	30 (-1)	90 (1)	3 (1)
5 (-1)	30 (-1)	90 (1)	1 (-1)
5 (-1)	60 (1)	30 (-1)	3 (1)
5 (-1)	60 (1)	30 (-1)	1 (-1)
5 (-1)	60 (1)	90 (1)	3 (1)
5 (-1)	60 (1)	90 (1)	1 (-1)
7 (1)	30 (-1)	30 (-1)	3 (1)
7 (1)	30 (-1)	30 (-1)	1 (-1)
7 (1)	30 (-1)	90 (1)	3 (1)
7 (1)	30 (-1)	90 (1)	1 (-1)
7 (1)	60 (1)	30 (-1)	3 (1)
7 (1)	60 (1)	30 (-1)	1 (-1)
7 (1)	60 (1)	90 (1)	3 (1)
7 (1)	60 (1)	90 (1)	1 (-1)
4,4(-1,66)	45 (0)	60 (0)	2 (0)
7,5(+1,66)	45 (0)	60 (0)	2 (0)
6 (0)	68 (+1,66)	60 (0)	2 (0)
6 (0)	21(-1,66)	60 (0)	2 (0)
6 (0)	45 (0)	13(-1,66)	2 (0)
6 (0)	45 (0)	106 (+1,66)	2 (0)
6 (0)	45 (0)	60 (0)	0,4(-1,66)
6 (0)	45 (0)	60 (0)	3,5(+1,66)
6 (0)	45 (0)	60 (0)	2 (0)
6 (0)	45 (0)	60 (0)	2 (0)
6 (0)	45 (0)	60 (0)	2 (0)

Fonte: A autora

Após, adicionou-se os extratos em um banho de gelo durante 10 min. Em seguida, adicionou-se em cada extrato 23 mL de álcool etílico 99% e colocou-se em uma mesa agitadora, à temperatura ambiente e submetidos à agitação 120 rpm com tempo determinado de 60 min. Filtrou-se o material com papel filtro e preparou-se a amostra em um balão de 10 mL, sendo 2 mL de extrato e completou-se com uma solução metanol e água 50%. Em seguida filtrou-se com filtro de seringa PVDF (25 mm x 0,45 µm) a amostra e analisou-se o extrato diretamente por cromatografia líquida de alta eficiência.

4.7 Análise estatística

Realizou-se análise estatística aplicando o *software* Statistica versão 10 nos experimentos referentes à extração da cumarina e do ácido o-cumárico por turbólise utilizando enzima celulase.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

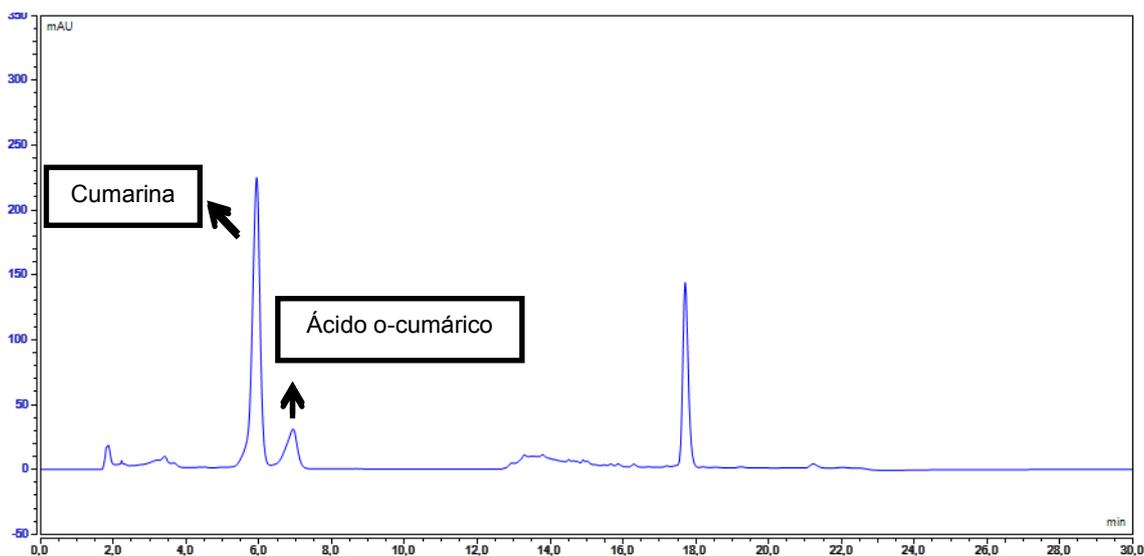
5.1 Identificação da cumarina e do ácido o-cumárico nas amostras

Para a análise da concentração de cumarina e ácido o-cumárico utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com tempo total de 30 minutos, uma vez que a matriz é uma mistura complexa de vários componentes. Segundo Melo e Sawaya (2015) o tempo de análise destas substâncias podem variar de 10 a 30 minutos, dependendo do tipo e comprimento da coluna utilizada. Este tempo é necessário para poder separar os metabólitos secundários e determinar seus tempos de retenção para posterior identificação.

Deste modo, realizou-se a análise cromatográfica da amostra de *M. glomerata*, do padrão de cumarina e ácido o-cumárico e da amostra com adição de padrão, nos seguintes comprimentos de onda: 280 nm, 340 nm, 220 nm, 254 nm, porém o que apresentou uma melhor resposta foi o comprimento de 280 nm, assim os seguintes cromatogramas seguem este comprimento.

Na Figura 7, apresenta-se o cromatograma da amostra de *M. glomerata* no comprimento de onda de 280nm.

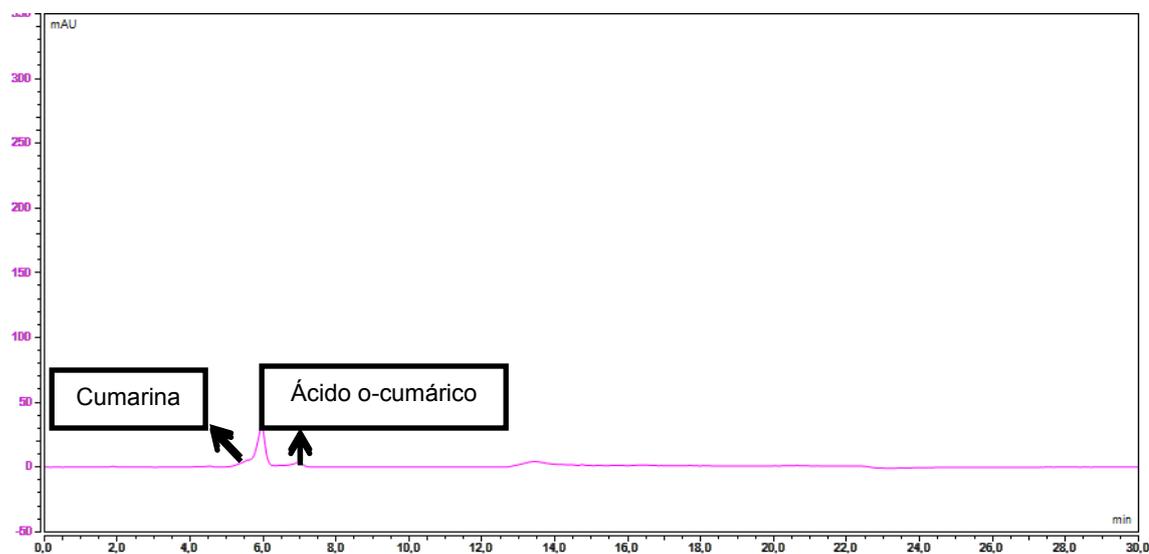
Figura 7 - Cromatograma da amostra de *M. glomerata* no comprimento de onda de 280nm



Fonte: A autora

Na Figura 8, o cromatograma do padrão da cumarina e do ácido o-cumárico no comprimento de onda de 280nm.

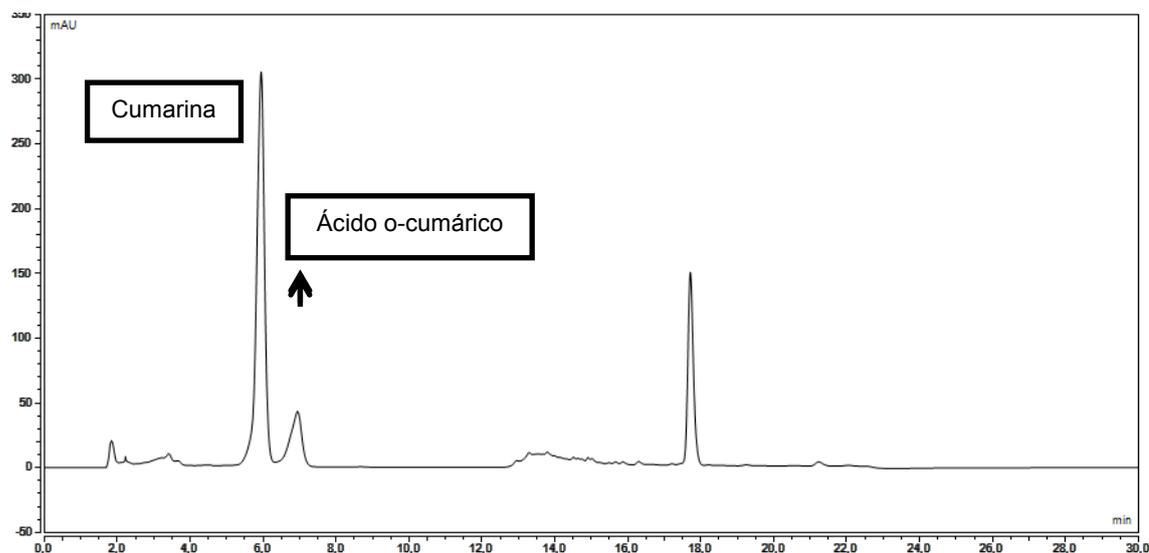
Figura 8 - Cromatograma dos padrões de cumarina e ácido o-cumárico no comprimento de onda de 280 nm



Fonte: A autora

Na Figura 9 o cromatograma da amostra de *M. glomerata* com adição de padrão da cumarina e do ácido o-cumárico no comprimento de onda de 280 nm.

Figura 9 - Cromatograma da amostra de *M. glomerata* com adição de padrão de cumarina e ácido o-cumárico no comprimento de onda de 280nm

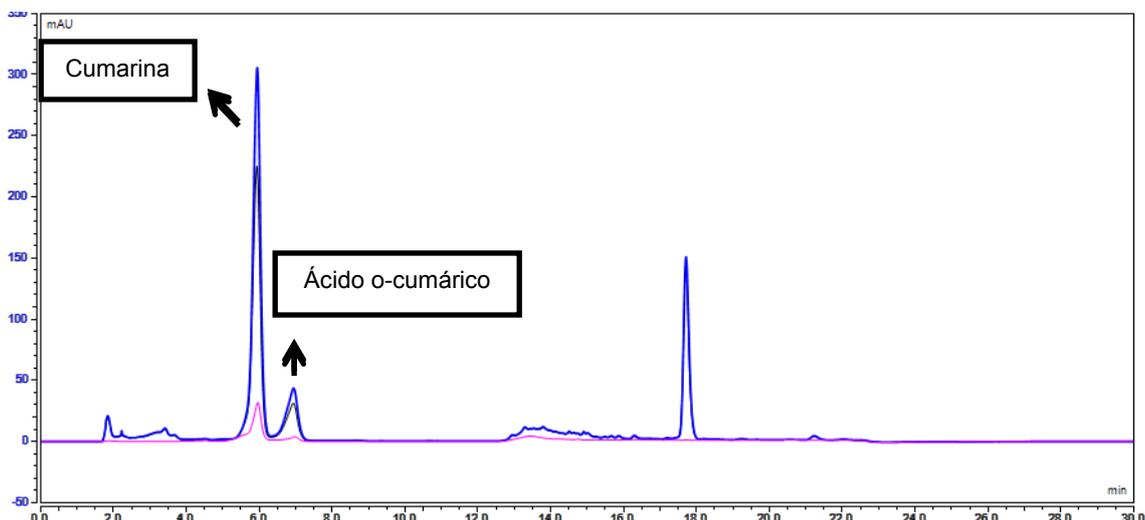


Fonte: A autora

Assim, ao sobrepor os cromatogramas conforme a Figura 10, verifica-se que os cromatogramas seguem o padrão de cumarina e ácido o-cumárico, ou seja, o

tempo de retenção da cumarina ($\cong 6$ min) e do ácido o-cumárico ($\cong 7$ min) é o mesmo nas amostras.

Figura 10 - Cromatograma do padrão de cumarina e de ácido o-cumárico, cromatograma da amostra de *M. glomerata* e o cromatograma da amostra *M. glomerata* com adição de padrão



Fonte: A autora

Legenda: Cromatograma rosa: padrão (cumarina e ácido o-cumárico); cromatograma preto: amostra de *M. glomerata*; cromatograma azul: amostra fortificada com padrão (cumarina e ácido o-cumárico).

Deste modo, os cromatogramas obtidos para identificação da cumarina e do ácido o-cumárico auxiliam na quantificação dos metabolitos secundários de interesse presentes nas amostras de *M. glomerata*.

5.2 Extração da cumarina e do ácido o-cumárico por maceração

A partir das equações da reta da cumarina e do ácido o-cumárico apresentadas no item 4.3, obteve-se os valores dos teores de cumarina e ácido o-cumárico dos extratos por maceração de *M. glomerata* (lote: GUP180701) durante 4 e 7 dias. Os mesmos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 -Teor de cumarina e ácido o-cumárico (g 100mL⁻¹) em extratos de *M. glomerata* obtidos por maceração durante 4 e 7 dias em diferentes tempos de agitação

Concentração (%)	Tempo (min)	Teor 4 dias (g 100mL ⁻¹)		Teor 7 dias (g 100mL ⁻¹)	
		cumarina	o-cumárico	cumarina	o-cumárico
50	30	0,053	0,014	0,062	0,018
50	60	0,069	0,017	0,064	0,018
50	90	0,052	0,013	0,062	0,019
50	120	0,060	0,016	0,069	0,019
70	30	0,083	0,016	0,081	0,020
70	60	0,099	0,021	0,088	0,020
70	90	0,097	0,021	0,112	0,024
70	120	0,100	0,023	0,103	0,022
90	30	0,070	0,008	0,071	0,008
90	60	0,074	0,007	0,069	0,007
90	90	0,066	0,007	0,077	0,007
90	120	0,050	0,004	0,074	0,004

Fonte: A autora

Ao comparar os teores de cumarina e de ácido o-cumárico da Tabela 5, observa-se que no período de 7 dias houve uma maior extração. Neste tipo de extração quanto maior for o tempo de contato da planta com o solvente mais completa será a extração, pois será dada mais oportunidade de ocorrer um maior fluxo de difusão do solvente por meio da parede celular da droga contribuindo para equilibrar a concentração de ativos dentro e fora dos seus tecidos.

Com isso, realizou-se a extração dos metabolitos secundários utilizando a amostra de *M. glomerata* lote: GUP190201 durante o período de 7 dias. Na Tabela 6, apresenta-se os teores de cumarina e de ácido o-cumárico nas amostras.

Tabela 6 - Teor de cumarina e de ácido o-cumárico (g 100mL⁻¹) em amostras de *M. glomerata* (lote: GUP190201) em preparo de extratos por maceração durante 7 dias em diferentes tempos de agitação

Concentração (%)	Tempo (min)	Teor (g 100mL ⁻¹)	
		cumarina	o-cumárico
50	30	0,056	0,008
50	60	0,057	0,008
50	90	0,055	0,007
50	120	0,049	0,006
70	30	0,064	0,009
70	60	0,070	0,010
70	90	0,052	0,007
70	120	0,067	0,009
90	30	0,066	0,008
90	60	0,061	0,008
90	90	0,043	0,006
90	120	0,049	0,006

Fonte: A autora

A concentração de 70% apresentou um maior teor de cumarina e de ácido o-cumárico conforme apresentado nas Tabelas 5 e 6. Assim, para obter um extrato com maior teor em princípio ativo, a planta *M. glomerata* deve ser submetida a uma mistura hidroalcoólica a 70% em um período de 7 dias, conforme recomendado pela farmacopeia.

Em relação ao tempo de agitação, podemos observar que o mesmo apresentou algumas divergências, ou seja, se comparar os tempos não houve diferença.

Baseando-se nos resultados obtidos, fez-se uma análise de comparação entre os lotes, ambos obtiveram a melhor extração na concentração de 70 % de álcool etílico. Devido à diferença dos lotes há uma divergência na quantidade de teor de cumarina e de ácido o-cumárico, isso justifica-se devido aos dados fornecidos pelo certificado de análise dos lotes.

De acordo com esses dados, a porcentagem de recuperação do lote GUP180701 foi de 66,9% e do lote GUP190201 foi de 68,5 %, ou seja, o lote GUP190201 houve uma maior porcentagem de recuperação de cumarina.

5.3 Extração da cumarina e do ácido o-cumárico por turbólise

Nessa técnica, a extração ocorre, concomitantemente, com a redução do tamanho da partícula, resultado da aplicação de elevadas forças de cisalhamento. A redução drástica do tamanho de partícula e o consequente rompimento das células favorecem a rápida dissolução das substâncias, resultando em tempos de extração da ordem de minutos e o quase esgotamento da droga (SIMÕES et al., 2010). Com este método de extração obteve-se os extratos de *M. glomerata* lote: GUP190201 e analisou-os. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Dados do teor (g mL⁻¹) de cumarina e ácido o-cumárico em extratos de *M. glomerata* utilizando extração por turbólise em diferentes tempos de agitação

Tempo (min)	Concentração (%)	Teor g mL ⁻¹ (média±D.P)	
		cumarina	o-cumárico
1	50	0,057 ± 0,001	0,008 ± 0,001
3	50	0,076 ± 0,001	0,007 ± 0,001
5	50	0,064 ± 0,006	0,008 ± 0,006
1	70	0,069 ± 0,009	0,007 ± 0,009
3	70	0,055 ± 0,004	0,007 ± 0,004
5	70	0,076 ± 0,008	0,013 ± 0,008
1	90	0,025 ± 0,007	0,003 ± 0,007
3	90	0,055 ± 0,004	0,003 ± 0,004
5	90	0,019 ± 0,000	0,002 ± 0,000

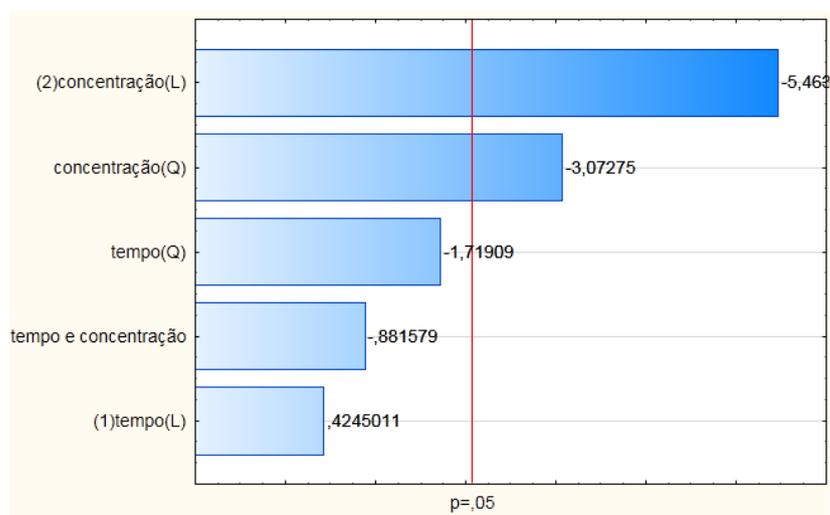
Fonte: A autora

A partir dos dados apresentados na Tabela 7, realizou-se uma análise estatística dos mesmos no *software* Statistica versão 10.

Deste modo, o coeficiente de determinação (R²) para o modelo de segunda ordem para a cumarina foi de 0,67, indicando que o modelo explica 67 % da variação dos dados observados. E para o ácido o-cumárico (R²) 0,80, assim 80 % dos dados são explicados.

Com isso, verificou-se qual fator é significativo para a extração da cumarina no diagrama de Pareto (Figura 11).

Figura 11- Diagrama de Pareto da cumarina para efeito da concentração e do tempo

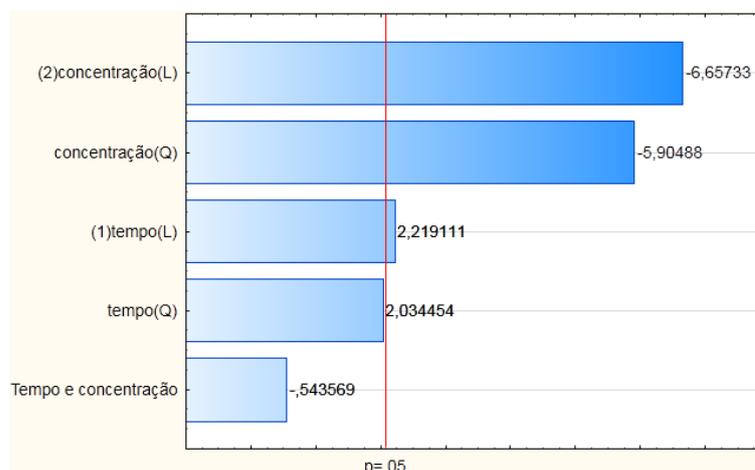


Fonte: A autora

Assim, apenas a concentração é significativa apresentando efeito linear (L) e quadrático (Q) de acordo com o diagrama de Pareto. Deste modo, como há um termo quadrático estatisticamente significativo, é possível concluir que a superfície de resposta contém curvatura (Figura 13). O tempo de extração geralmente é importante nos processos extrativos de medicamentos à base de plantas, pois podem alterar a cinética da remoção ativa da matriz da planta por deslocamento de equilíbrio. No entanto, a turbólise é uma extração de alta energia que requer tempo reduzido. Provavelmente esse fator não foi significativo devido aos curtos tempos de extração (MARTINS et al., 2017).

Na Figura 12 apresenta-se o diagrama de Pareto do ácido o-cumárico.

Figura 12 - Diagrama de Pareto do ácido o-cumárico para efeito da concentração e do tempo

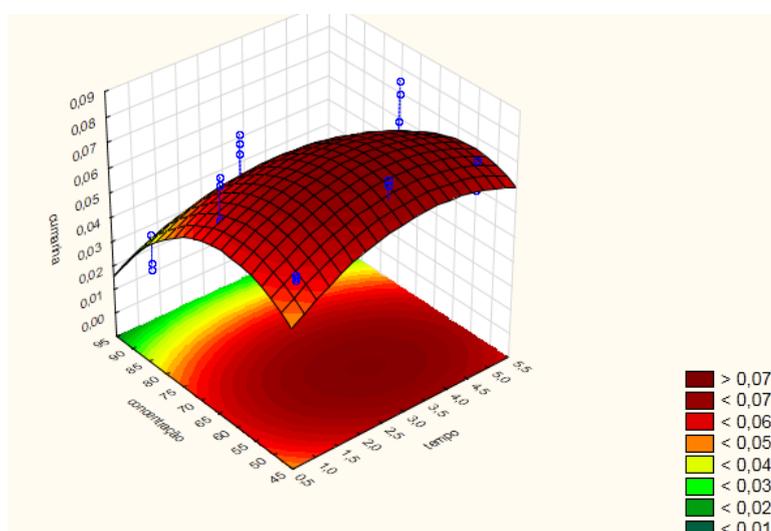


Fonte: A autora

Observa-se que a concentração (Q) e o tempo (L) influenciam na extração do ácido o-cumárico na espécie de *M. glomerata* utilizando como método a turbólise, assim, como apresenta-se na Figura 14, um gráfico de superfície com curvatura, devido a concentração ser quadrática.

Para verificar em qual concentração há maior teor de cumarina no processo de extração por turbólise da *M. glomerata* plotou-se o gráfico de superfície (Figura 13).

Figura 13 - Gráfico de superfície representação da influência do tempo e da concentração de solvente na extração de cumarina

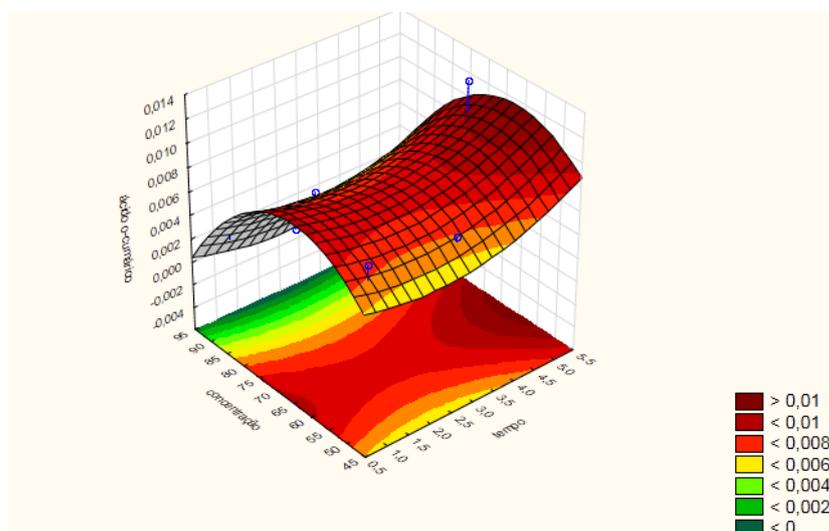


Fonte: A autora

Ao analisar a Figura 13 o modelo sugere que a maior extração de cumarina ocorreria no tempo de 3,35 min e na concentração 59% de álcool etílico.

No gráfico de superfície (Figura 14) é possível avaliar a influência do tempo e da concentração de solvente para a extração do ácido o-cumárico.

Figura 14 - Gráfico de superfície representação da influência do tempo e da concentração de solvente na extração do ácido o-cumárico



Fonte: A autora

De acordo com a Figura 14, no tempo de 5 min e na concentração 63 % de álcool etílico foi possível extrair uma maior quantidade de ácido o-cumárico.

Deste modo, observa-se na Tabela 8 os valores ótimos da extração por turbólise.

Tabela 8 - Valores ótimos previstos para tempo de turbólise e concentração de solvente para a extração de cumarina e do ácido o-cumárico em *M. glomerata*

Fatores	Valores Críticos (cumarina)	Valores Ótimos (ácido o-cumárico)
Tempo (min)	3,35	5,00
Concentração (%)	59	63

Fonte: A autora

Por meio desses dados, preparou-se quatro extratos na concentração de 59 % de álcool etílico grau analítico com tempo determinado de 3,35 min seguidos a temperatura ambiente. Os dados apresentam-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Média dos extratos no valor considerado ótimo

Tempo (min)	Concentração (%)	Teor(média±D.P) (cumarina)	Teor(média±D.P) (ácido o-cumárico)
3,35	59	0,075±0,001	0,008±0,001

Fonte: A autora

Em relação a porcentagem de recuperação deste método de extração foi de 74,4 % conforme o certificado de análise. Assim, pode-se considerar um método de extração eficiente para cumarina e ácido o-cumárico em *M. glomerata*, pois devido à trituração e homogeneização constante da droga vegetal e do solvente resulta em grandes rendimentos dos extratos (MARQUES; VIGO, 2009).

5.4 Extração da cumarina e do ácido o-cumárico utilizando enzima

No total efetuou-se 28 experimentos os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Teor de cumarina e de ácido o-cumárico para a extração de *M. glomerata* utilizando enzima celulase

pH	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Enzimas (U mg ⁻¹)	Teor cumarina (g 100mL ⁻¹)	Teorcumárico (g 100mL ⁻¹)
5	30	30	3	0,014	0,002
5	30	30	1	0,015	0,002
5	30	90	3	0,013	0,002
5	30	90	1	0,014	0,002
5	60	30	3	0,015	0,002
5	60	30	1	0,016	0,002
5	60	90	3	0,015	0,002
5	60	90	1	0,016	0,002
7	30	30	3	0,015	0,002
7	30	30	1	0,015	0,002
7	30	90	3	0,015	0,001
7	30	90	1	0,013	0,002
7	60	30	3	0,016	0,002
7	60	30	1	0,013	0,001

pH	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Enzimas (U mg ⁻¹)	Teor cumarina (g 100mL ⁻¹)	Teorcumárico (g 100mL ⁻¹)
7	60	90	3	0,014	0,002
7	60	90	1	0,014	0,002
4,4	45	60	2	0,016	0,002
7,5	45	60	2	0,015	0,002
6	21	60	2	0,016	0,002
6	45	13	2	0,015	0,002
6	45	106	2	0,015	0,002
6	45	60	0,4	0,014	0,002
6	45	60	3,5	0,014	0,002
6	30	30	1	0,015	0,002
6	60	90	3	0,015	0,002
6	45	60	2	0,015	0,002
6	45	60	2	0,015	0,002
6	45	60	2	0,014	0,002

Fonte: A autora

Podemos observar que a extração máxima de cumarina foi de 0,016 (g 100 mL⁻¹) e de ácido o-cumárico 0,002 (g 100 mL⁻¹). Assim, calculou-se os valores do coeficiente de correlação em uma equação de segunda ordem.

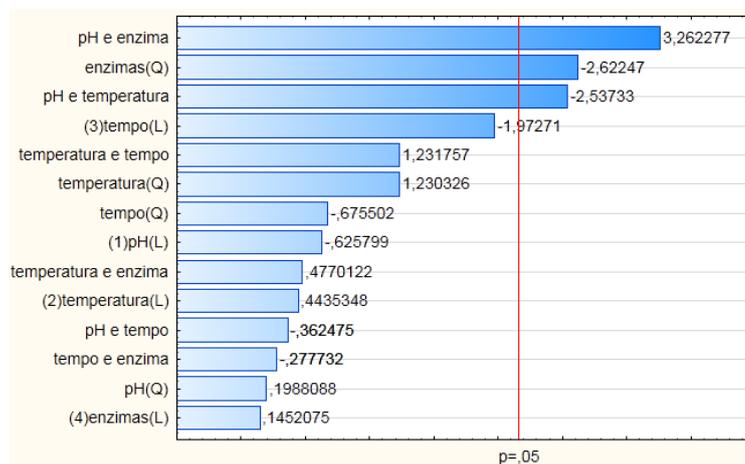
$$Y = 0,017 - 0,00056E^2 - 0,000029pH.T + 0,00056pH.E$$

Com os resultados do planejamento experimental apresentados na Tabela 10, o coeficiente de determinação (R^2) e a análise de variância – ANOVA foram utilizados para verificar a qualidade do ajuste dos modelos aos valores experimentais. Sendo (R^2) 0,71, indicando que o modelo de segunda ordem explica 71% da variação dos dados observados para a extração da cumarina nas amostras de *M. glomerata*. Em relação ao coeficiente de determinação do ácido o-cumárico o mesmo foi de 0,55, ou seja, apenas 55% da variação dos dados são explicados.

De acordo com a ANOVA para a extração da cumarina, quanto menor o valor de p mais significativo o coeficiente correspondente. Assim sendo, os fatores significativos foram a enzima, pH em relação a enzima e pH em relação a temperatura, conforme apresentado na Figura 15 no diagrama de Pareto. Para o ácido o-cumárico não houve valores significativos nesse experimento, assim sendo,

considera-se apenas a cumarina como principal metabólito secundário da *M. glomerata* para fins de análise estatística.

Figura 15 - Diagrama de Pareto para a extração utilizando enzima da cumarina na amostra de *M. glomerata*

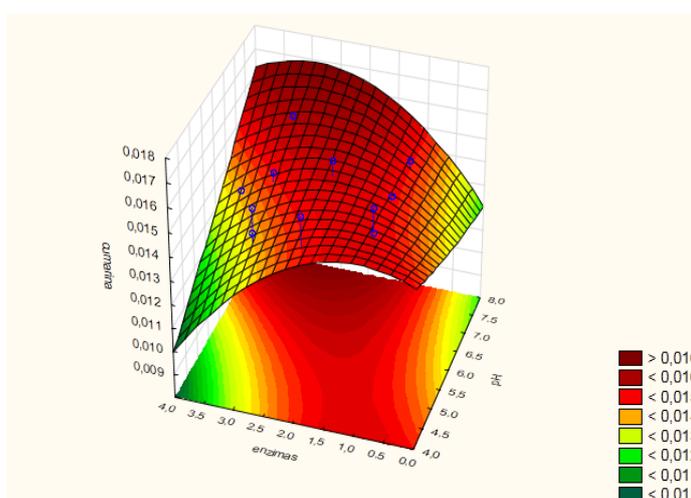


Fonte: A autora

A partir do diagrama de Pareto afirma-se que os fatores como pH, quantidade de enzima e temperatura contribuíram significativamente para a extração da cumarina.

No gráfico de superfície resposta é possível avaliar os efeitos das variáveis independentes na eficiência da extração de cumarina mantendo o tempo e a temperatura constantes. Na Figura 16 os efeitos da enzima em relação ao pH.

Figura 16 - Gráfico de superfície representação da influência do pH e da enzima na extração de cumarina



Fonte: A autora

Deste modo, observa-se na Figura 16 que houve um maior teor de cumarina no pH 7 e a quantidade de enzima em 2,5. Assim, o valor considerado ótimo para cada fator apresenta-se na Tabela 11, ou seja, as condições consideradas ideais para extrair melhor a cumarina do guaco.

Tabela 11 - Valor considerado ótimo da extração de *M. glomerata* utilizando enzima celulase

Tempo (min)	Ph	Temperatura (°C)	Enzima (U mg ⁻¹)
34,8	6,7	49,8	2,4

Fonte: A autora

Com isso, realizou-se a extração com os valores considerados ótimos, o resultado apresenta-se na Tabela 12.

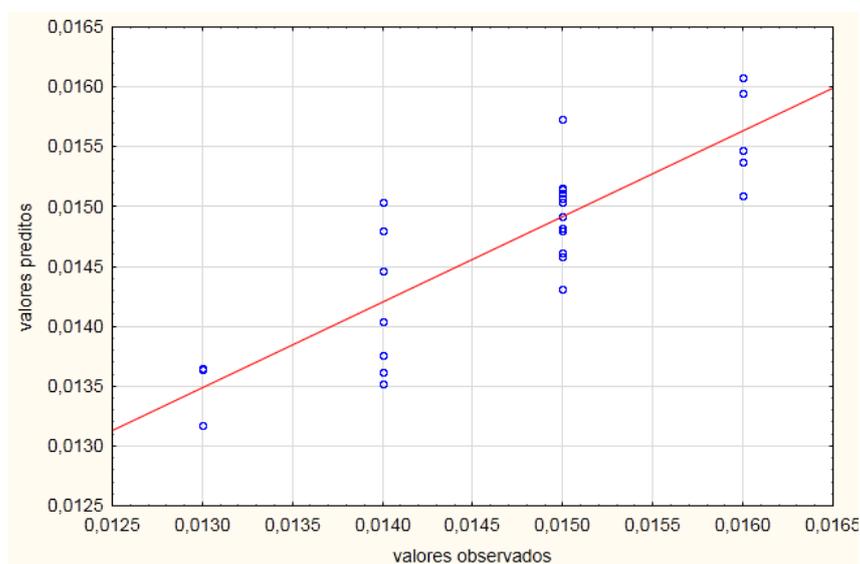
Tabela 12 - Teor de cumarina da extração de *M. glomerata* utilizando enzima celulase do valor considerado ótimo

Tempo (min)	pH	Temperatura (°C)	Enzima (U mg ⁻¹)	Teor(g 100mL ⁻¹)
34,8	6,7	49,8	2,4	0,016

Fonte: A autora

Isso mostrou-se que há uma relação entre os valores observados e os valores preditos conforme observa-se na Figura 17.

Figura 17 - Gráfico dos valores observados e dos valores previstos da extração de *M. glomerata* utilizando enzima celulase



Fonte: A autora

Em relação a porcentagem de recuperação deste método de extração foi de 97% conforme o certificado de análise do lote (GUP190201) há 0,4% de cumarina e 5,52% de umidade a cada 100g de guaco. Isso se justifica, pois as enzimas hidrolisam os componentes da parede celular e, conseqüentemente, ocorre a liberação de compostos bioativos, o que promove o aumento recuperação destes compostos a partir da matriz vegetal (PINELO; ARNOUS; MEYER, 2006).

Com isso, a utilização de enzimas no processo de extração apresenta mais vantagens em relação aos métodos de extração convencionais, pois oferece maior rendimento e menor gasto de tempo na extração, o produto final apresenta maior qualidade devido à ausência de resíduos de solventes e baixo consumo de energia.

No entanto, essa é uma técnica que apresenta limitações, devido ao elevado custo para o processamento de grandes volumes de matéria-prima, a disponibilidade de preparações enzimáticas que não podem hidrolisar completamente as paredes celulares de vegetais, a dificuldade do uso em escala industrial (BAIANO, 2014).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que estudos na área de extração de plantas medicinais são fundamentais para a obtenção de produtos de qualidade, uma vez que a escolha do método é fundamental para aumentar a extração de princípios ativos.

Assim, ao comparar os três métodos de extração realizados, o método utilizando enzima celulase foi o mais eficiente na extração da cumarina na amostra de *M. glomerata*, com isso, esse processo de extração é uma técnica aconselhável para essa extração, sendo que oferece muitas vantagens, como alto rendimento de extração, alta reprodutibilidade em tempos mais curtos, contudo o custo da enzima ainda é um fator limitante desta tecnologia.

O segundo método de extração mais eficiente foi a extração por turbólise, isso justifica-se pois esse processo reduz o tamanho da partícula e o conseqüentemente rompe as células, assim há uma rápida dissolução das substâncias, resultando em tempos de extração rápidos, assim sendo os métodos não convencionais tornam-se interessantes para a rotina do controle de qualidade industrial, visando a obtenção de medicamentos fitoterápicos padronizados.

Em relação ao terceiro método (maceração), também foi possível extrair os metabolitos secundários de interesse presentes na amostra de *M. glomerata*, porém em menor quantidade comparado aos dois outros métodos realizados. Assim, pode-se substituir o processo de extração por maceração indicado na Farmacopeia por processos de extração mais rápidos e eficientes, como a turbólise ou através da extração com auxílio de enzimas.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Fundação Oswaldo Cruz, 2010.
- AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426-36, 2013.
- BAIANO, A. Recovery of biomolecules from food wastes: A review. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14821–14842, 2014.
- BARBA, F. J. et al. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and byproducts: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 96-109, 2016.
- BARRETO, B. B. **Fitoterapia na Atenção Básica a Saúde- a visão dos profissionais envolvidos**. 2011. 98 p. Dissertação- Universidade Federal de Juiz de Fora. Minas Gerais, 2011.
- BESSA, L. C. B.A. et al. Simulation and process design of continuous countercurrent ethanolic of rice bran oil. **Journal of Food Engineering**, v. 202, p. 99-113, 2017.
- 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. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC-SUS**. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA nº 18, de 03 de abril de 2013. Dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial da União**, nº 65, de 5 de abril de 2013. Brasília, 2013.
- BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. DE M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2675-2685, 2012.
- CARVALHO, T. F. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro do extrato seco de Hyptis pectinata (L.)**, 2019.
- COTIN, R. D. **Alterações anatômicas e fisiológicas em plantas de Mikania glomerata Sprengel e Mikania Laevigata Schultz Bip. Ex Baker, sob diferentes condições de luminosas e nutricionais**. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 2009.

CUNHA, A. P. **Farmacologia e Fitoquímica: Cumarinas**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, p. 226-231, 2009.

CZELISNIAK, K. E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2012.

GAMSE, T. **Liquid-liquid extraction and solid-liquid extraction**. Institute of Thermal Process and Environmental Engineering, Graz University of Technology, 2002.

GASPARETTO, J. C.; PECCININI, R. G.; FRANSISCO T. M. G.; CERQUEIRA, L. B.; CAMPOS, F. R.; PONTAROLO, R. **A kinetic study of the main guaco metabolites using syrup formulation and the identification of an alternative route of coumarin metabolism in humans**, 2015.

HANDA, S. S.; KHANUJA, S. P. S.; LONGO, G.; RAKESH, D. D. **Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants**. Trieste: ICS Unido, 2008. p. 266.

HENRIQUE, M. A., **Estudo Cinético da Decomposição Térmica de Nanocristais de Celulose de Caroco de Manga, Eucalipto e Celofane**. Universidade Federal de Uberlândia, 2014.

KATSORI, A. M.; HADJIPAVLOU, L. D. **Coumarin derivatives: an updated patent review**. Expert Opin Ther Pat, 2014.

KOTOVICZ, V. **Extração rápida de compostos solúveis de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) por ciclos de compressão e descompressão hidrostática: experimentos, modelagem e simulação**, 2014.

LAROZE, L.; SOTO, C.; ZUNIGA, M. E. Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 2-11, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MACHADO, C. M. R. A. **Obtenção de produtos a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.:** otimização da extração e secagem em spray dryer utilizando planejamentos experimentais. Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2011

MARQUES, L. C.; VIGO, C. L. S. Preparação e padronização de extratos vegetais. **Revista Racine**, v. 3, n. 1, 2009.

MARTINS, Paula M. et al. Turbo-extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* using a fractional factorial design. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p-510-518, 2017.

MELO, L. V. & SAWAYA, A. C. H. F., **UHPLC-MS quantification of coumarin and chlorogenic acid in extracts of the medicinal plants known as guaco (*Mikania glomerata* Spreng. And *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker)**. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2015.

MEREGALLI, M. **Estudo comparativo de diferentes métodos de extração de compostos bioativos da casca do araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine)**. Uri Campus Erechim, Rio Grande do Sul, 2017.

NAPIMOGA, M. H.; YATSUDA, R. Scientific evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2010.

OGEDA, L. T.; PETRI, S. F. D. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, São Paulo, 2010.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. Genebra: OMS, 2002.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, J. Extration of antioxidante phenolics from almond hulls (*prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). **Food Chemistry**, v. 85, p.267-273, 2004.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

SERRANO, A. B. et al. Comparative assessment of three extraction procedures for determination of emerging *Fusarium* mycotoxins in pasta by LC-MS/MS. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 105-114, 2013.

SIMÕES, C. M. O, SCHENCKEL E.P., GOSMANN G., PETROVICK P. R. **Desenvolvimento de medicamento**. 2010.

SILVA, A. S. B.; OWITI, A. O.; BARBOSA, W. L. R. Pharmacology of *Mikania* genus: A systematic review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 12, n. 24, 2018.

SILVA, S. C. N. et al. **The use of medicinal and phytotherapy plants for health**. Faculdade Única de Ipatinga, Ipatinga, Minas Gerais, 2017.

SOUZA, J. S. S.; GOMES, E. C.; ROCHA, T. C.; BOGER, B. **Uso de plantas medicinais por comunidades do município de Curitiba**, 2018.

TEIXEIRA, D. A. **Produção de biomassa e teor de cumarina em duas espécies de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip ex Baker) em função da adubação orgânica**. Bocatú, 2017.

TIWARI, P. et al. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v.1, n.1, p.98-106, 2011.

VEIGA, J. V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-28, 2005.

VIEIRA, G. S. Estudo dos processos de extração de Antocianinas da polpa de juçara (*Euterpe edulis Mart.*) E da concentração do extrato por nanofiltração. 2015. 249 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). UNICAMP, Campinas. 2015.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, p. 300-312, 2006.

XU, B. J.; CHANG, S. K. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**, v. 72, p.159-166, 2007.

ZANCHETTA, A. **Celulases e suas aplicações**. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Ibilce-Unesp, SP, Brasil, 2013.

ZENI, A. L. B. et al. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2703-2712, 2017.