

Rendimento extrativo de cumarina de folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) submetidas a diferentes temperaturas de secagem

RADÜNZ, L.L.¹; MELO, E.C.^{2*}; BARBOSA, L.C.A.²; ROCHA, R.P.²; BERBERT, P.A.³

¹Universidade Federal da Fronteira Sul, Avenida Dom João Hoffmann, 313, CEP: 99700-000, Erechim-Brasil

²Universidade Federal de Viçosa, Avenida P.H. Rolfs, s/n, CEP: 36570-00, Viçosa-Brasil *evandro@ufv.br

³Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Avenida Alberto Lamego, 2000, CEP: 28013-602, Campos dos Goytacazes-Brasil

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura do ar de secagem no rendimento extrativo da cumarina de folhas de guaco. Foram empregados 6 tratamentos de secagem, sendo ar ambiente, ar aquecido a 40, 50, 60, 70 e 80°C. Utilizou-se secador de bandejas, tendo como fonte de aquecimento o gás liquefeito de petróleo (GLP). Os rendimentos extrativos da cumarina, depois de realizada a secagem, foram comparados com os valores obtidos da planta fresca (tratamento testemunha). A extração da cumarina foi realizada pelo método a quente, em banho-maria a 65°C, sendo a identificação e quantificação realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em função dos resultados obtidos, pôde-se concluir que a temperatura do ar de secagem a 50°C possibilitou o melhor resultado para o rendimento extrativo de cumarina em folhas de guaco.

Palavras-chave: plantas medicinais, técnicas de secagem, *Mikania glomerata*, guaco

ABSTRACT: Extraction yield of coumarin from guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) leaves subjected to different drying temperatures. The aim of this study was to evaluate the effect of drying on the extraction yield of coumarin from guaco leaves. Six drying treatments were used, being room air, heated air at 40, 50, 60, 70 and 80°C. A tray dryer was used with liquefied petroleum gas (LPG) as heating source. The extraction yield of coumarin, after drying, was compared to the values obtained from the fresh plant (control treatment). Coumarin extraction was carried out by using the heat method, in water bath at 65°C, and identification and quantification were done by means of high performance liquid chromatography (HPLC). Considering the obtained results, the temperature of the drying air at 50°C led to the best result for the extraction yield of coumarin in guaco leaves.

Key words: Medicinal plants, drying technique, *Mikania glomerata*, guaco

INTRODUÇÃO

A *Mikania glomerata* Sprengel, conhecida popularmente como guaco, é planta medicinal brasileira empregada em medicamentos para tosse e problemas respiratórios (Panizza, 1997). Encontra-se comercializado principalmente nas formas farmacêuticas de extrato fluido, tintura e xarope. Com fins medicinais, a planta é empregada comumente como broncodilatadora e expectorante, sendo útil em afecções do aparelho respiratório (gripe, tosse, ronqueira, bronquite e asma), sendo também empregada em reumatismos, nevralgias, e como sudorífera, febrífuga, depurativa e cicatrizante (Low et al., 1999).

As cumarinas são amplamente distribuídas

nos vegetais, mas também podem ser encontradas em fungos e bactérias. Estruturalmente são lactonas do ácido o-hidroxicinâmico (2H-1-benzopiran-2-ona), sendo o representante mais simples a cumarina (1,2-benzopirona). Cerca de 1.300 cumarinas já foram isoladas de fontes naturais. As propriedades farmacológicas, bioquímicas e aplicações terapêuticas dependem dos padrões de substituição (Kuster & Rocha, 2003).

Na área de medicamentos destacam-se os derivados da 4-hidróxi-cumarina, descobertos durante a investigação de uma doença hemorrágica no gado alimentado com trevo-de-cheiro-amarelo fermentado (*Melilotus officinalis* Lam.), o que levou à descoberta

da ação anticoagulante do dicumarol. Esse foi o primeiro fármaco com essa ação por via oral e constitui o modelo para o desenvolvimento de uma classe de anticoagulantes com o núcleo básico 4-hidróxicumarina, do qual derivam importantes fármacos. Recentemente, algumas cumarinas com atividade anti-HIV foram identificadas a partir de fontes vegetais, como exemplo cita-se os calanolídeos A e B, isolados das folhas de uma árvore de floresta tropical, *Calophyllum lanigenum* Miq. var. austrocoriaceum, família Clusiaceae, encontrada na Malásia. Essas substâncias inibiram a 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 (Kuster & Rocha, 2003).

Radünz et al. (2006) utilizaram hortelã-comum (*Mentha x villosa* Huds), secando-a em secador de bandejas com ar à temperatura ambiente e aquecido a 40, 50, 60, 70 e 80°C. Avaliaram o rendimento do óleo essencial extraído após a secagem com o rendimento obtido para a planta fresca. Com base nos resultados obtidos, concluíram que o maior rendimento extrativo foi obtido quando o processo de secagem foi realizado com temperatura do ar de secagem a 50°C. Rocha et al. (2000) obtiveram o maior rendimento de óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) secando-a 60°C. Estes autores concluíram que, possivelmente, de alguma forma esta temperatura interfira na permeabilidade ou resistência físico-mecânica dos tecidos vegetais, ajudando a reter os compostos voláteis nas estruturas originais.

Barbosa et al. (2006) submeteram folhas de *Lippia alba* a 6 tratamentos de secagem, sendo o uso de ar à temperatura ambiente (25°C) e ar aquecido à 40, 50, 60, 70 e 80°C, comparando estes com a planta fresca (tratamento testemunho). Verificaram que o teor de citral apresentou aumento significativo quando as folhas foram submetidas à secagem, independentemente do tratamento, quando comparados à planta fresca. Consideraram que este aumento pode ser atribuído à oxidação do geraniol durante o processo de secagem, convertendo-se em geranial. Observaram ainda que o conteúdo de nerol não diferiu significativamente entre os tratamentos de secagem, mas apresentou diminuição estatisticamente significativa quando comparado com a planta fresca. Atribuíram esta diminuição à oxidação do nerol durante a secagem, convertendo-se em neral. Considerando que o citral é o principal constituinte químico de interesse no óleo dessa planta, concluíram que a secagem desta planta, para fins de comercialização, pode ser realizada utilizando ar aquecido de 40 até 80°C.

Com o objetivo de avaliar a influência da temperatura do ar de secagem de *Ocimum selloi* Benth, quanto a produção e a composição do óleo

essencial, David et al. (2006) observaram que o rendimento de óleo essencial não apresentou variação significativa. Os principais componentes foram elimicina (69,8%), o *trans*-cariofileno (6,0%), o germacreno D (3,7%) e o biciclogermacreno (3,5%) e verificaram que o aumento da temperatura causou redução dos componentes. Portanto, concluíram que a secagem com a temperatura de 40°C foi a mais indicada para a espécie.

Soares et al. (2007) estudaram a influência de 4 temperaturas de ar de secagem (40, 50, 60 e 70°C), em camada fina, e 2 velocidades do ar (0,9 e 1,9 m s⁻¹) sobre o teor de óleo essencial e de linalol do manjerição (*Ocimum basilicum* L). Os maiores rendimentos de óleos essenciais foram obtidos no processo de secagem com temperatura do ar igual a 40°C e 1,9 m s⁻¹ de velocidade do ar. Os maiores rendimentos de linalol foram obtidos com temperatura do ar de secagem na faixa de 50 a 60°C e 1,9 m s⁻¹ de velocidade do ar. Concluíram que a composição química do óleo essencial do manjerição foi afetada tanto pela temperatura como pela velocidade do ar de secagem.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito da temperatura do ar de secagem (temperatura ambiente e 40, 50, 60, 70, 80°C) sobre o rendimento extrativo de cumarina, presente nas folhas de guaco.

MATERIAL E MÉTODO

O trabalho foi realizado na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para condução do experimento foi empregado o delineamento experimental em blocos casualizados, com três repetições. Em cada bloco era realizada a secagem de um conjunto completo de todos os tratamentos de secagem, bem como a extração da cumarina, objetivando-se, dessa forma, minimizar o efeito do armazenamento do guaco após a secagem. Foram realizados seis tratamentos de secagem, sendo secagem com ar em temperatura ambiente e ar aquecido a 40, 50, 60, 70 e 80°C. A secagem com ar natural foi realizada no mesmo secador dos demais tratamentos, porém com o sistema de aquecimento do ar desligado.

As avaliações estatísticas do rendimento da cumarina, obtidos depois do guaco seco, bem como das folhas frescas (tratamento testemunho), foram realizadas pela análise de variância e, quando necessário, aplicado o teste de comparação múltipla de médias - Duncan a 5% de probabilidade - com auxílio do programa para análises estatísticas SAEG (2007).

As folhas foram coletadas no horário compreendido entre as 7h e 8h30min, sendo o material encaminhado imediatamente ao laboratório para

seleção, determinação do teor de água e posterior secagem. A seleção consistiu em retirar as partes doentes e danificadas, assim como qualquer parte de outro vegetal ou material estranho que pudesse se encontrar presente, homogeneizando-se em seguida o material restante.

Para determinação do teor de água foi utilizada a metodologia recomendada pela ASAE STANDARDS (ASAE, 2000), utilizando-se 25 g, em três subamostras, em estufa com circulação forçada do ar e com temperatura de $103\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas.

Foi utilizado para os testes de secagem, secador de bandejas com fluxo ascendente de ar, tendo como fonte de aquecimento o gás liquefeito de petróleo (GLP), como descrito por Radünz (2004).

As folhas foram secadas inteiras, sem picar, utilizando-se apenas 2 bandejas do secador, a segunda e a terceira ascendente, sem estarem completamente cheias, totalizando uma massa de 0,5 kg por tratamento. A utilização da carga incompleta se justificou pela quantidade de material vegetal disponível.

A temperatura do ar de secagem foi monitorada com auxílio de sistema automático de aquisição de dados. A medição da velocidade do ar de secagem foi realizada com auxílio de anemômetro de pás.

As amostras, após a secagem, foram embaladas em sacos de polietileno ($40\ \mu\text{m}$) e armazenadas em câmara climatizada a 5°C até o momento da extração dos componentes químicos.

Para extração da cumarina as folhas de guaco foram picadas transversalmente às nervuras, em partes inferiores a 1 mm de largura e comprimento inferior a 5 mm. Foi empregado o método de extração a quente, em banho-maria a 65°C , por 90 minutos, utilizando-se 7 mL de metanol, sendo o método adaptado e ajustado ao de Andrade (2000). Durante a extração foram realizadas 3 coletas, a cada intervalo de 30 minutos e, posteriormente, agrupadas e acondicionadas em frascos de vidro de 25 mL.

O ajuste do tempo de extração foi determinado através de testes preliminares, coletando-se, separadamente, alíquotas a cada 30 minutos durante o período de 120 minutos. As alíquotas coletadas, juntamente com o padrão 1,2-benzopirona (cumarina) produzido pela empresa Sigma-Aldrich, com pureza de 99,9%, foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD). Então, para cada tempo de coleta, as alíquotas e o padrão foram analisados por CCD com fase estacionária sílica gel (camadas de aproximadamente 0,25 mm de espessura), usando-se como fase móvel acetato de etila e hexano (1,5:1, volume/volume) e como revelador uma solução de KOH a 5% e 10% de metanol, seguido de revelação sob luz ultravioleta a

254 nm. O tempo de extração utilizado foi aquele em que não se observou mais a presença da cumarina na cromatoplaça, o que ocorreu com o tempo de 90 minutos de extração.

Depois de realizada a extração da cumarina, as amostras foram deixadas para concentrar sob temperatura ambiente em capela, até obtenção de volume inferior a 3 mL. Primeiramente, os frascos foram envolvidos em papel alumínio e na parte do bocal foram realizadas pequenas perfurações, evitando-se a exposição direta à luz e contaminação por algum resíduo sólido. Após a concentração das amostras, foi realizada a pré-filtragem e, em seguida, procedeu-se a filtragem das mesmas. A pré-filtragem foi realizada com auxílio de pipeta de Pasteur inserindo algodão como elemento filtrante e borracha do tipo conta-gotas para aumentar a pressão e possibilitar a filtragem. O objetivo deste procedimento foi a eliminação de partículas maiores contidas na amostra, que causariam problemas na etapa de filtragem. Para a filtragem se empregou cartucho para extração em fase sólida (SPE) de modo reverso (SEP-PACK C18) da Waters Millipore, contendo 50 mg de sorbente sílica, tamanho de partícula entre $55\text{--}105\ \mu\text{m}$, faixa de pH de 2 a 8 e capacidade de 3 mL. A filtragem foi realizada a vácuo com auxílio de frasco Kitasato, onde primeiramente, o cartucho foi ativado filtrando-se 3 mL de metanol; logo em seguida, a amostra foi filtrada, sendo o filtro posteriormente lavado com acetona, no mínimo 3 vezes. O objetivo da filtragem foi eliminar os pigmentos (clorofila) presentes no extrato, o que acarretaria problemas durante a realização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Após a filtragem as amostras, estas foram concentradas até a evaporação total do solvente (resíduo), conforme o procedimento descrito anteriormente. O armazenamento das amostras foi realizado a -10°C até o momento da quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada com o emprego do equipamento Shimadzu LC-10A, acoplado ao detector UV/SPD-10 AV, sob as seguintes condições: pré-coluna NUCLEOSIL 5-Sílica-100A-5 micron ($30 \times 4\ \text{mm}$), coluna NUCLEOSIL 5-Sílica-100A-5 micron ($250 \times 4\ \text{mm}$), pressão interna da coluna de 39 kPa, fluxo da fase móvel de $0,6\ \text{mL min}^{-1}$, no modo isocrático, e comprimento de onda no detector ultravioleta de 274 nm. A fase móvel utilizada foi de acetato de etila e hexano, na proporção de 3:1, respectivamente. O volume de amostra injetado foi de $20\ \mu\text{L}$. O tempo para a realização de cada cromatografia foi de 20 min.

Para a quantificação da cumarina, nas amostras, foram realizadas injeções do padrão de cumarina (1,2-benzopirona) em diferentes concentrações. As amostras padrões foram preparadas com diclorometano nas concentrações de 5, 10, 15,

20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 e 150 ppm. As integrações das áreas foram realizadas pelo programa presente no próprio computador. Os resultados obtidos nos cromatogramas, expressos em áreas, foram correlacionados com as concentrações equivalentes das amostras padrões injetadas; quanto às concentrações de cumarina, tanto dos tratamentos de secagem como as das folhas frescas, foram transformadas para percentual, objetivando-se facilitar a interpretação dos resultados.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A temperatura média do ar ambiente foi de 21,5°C. O teor médio de água das folhas frescas foi de 82,34% base úmida (b.u.). A velocidade média do ar de secagem foi de 0,473 m s⁻¹. O teor final de água nas folhas de guaco, após a secagem, foi de 13,9; 9,63; 8,70; 6,70; 7,55 e 7,75 b.u., respectivamente, para a secagem com ar natural e aquecido a 40, 50, 60, 70 e 80°C.

Na Tabela 1 são demonstrados os resultados da análise estatística para os teores de cumarina (massa/massa), para as três épocas de colheita, definidas pelos blocos.

TABELA 1. Teor de óleo cumarina em folhas de guaco, obtido em função da época de colheita

Época de colheita	Teor de cumarina (% base seca.) ¹
20 e 21 de maio	0,4736 a
03 e 04 de maio	0,3854 b
21 e 22 de abril	0,2755 c

¹ Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan CV= 13,58%.

Observa-se que a época de colheita influenciou significativamente na quantidade de cumarina extraída das folhas de guaco.

Há possibilidades de que em determinados períodos do ano ocorra maior acúmulo de princípios ativos, o que pode ser devido a fatores genéticos e fisiológicos da planta, podendo-se inferir que ocorra nos meses de inverno.

Os fatores climáticos podem ter contribuído para estes resultados, como por exemplo, fotoperíodo, decréscimo da temperatura média, estresse hídrico, etc., estando de acordo com Pereira et al. (2000) que encontraram maior rendimento de cumarina em guaco no mês de julho e o menor em abril, com incremento quase linear entre esses períodos. Os autores afirmam que o maior rendimento de cumarina no mês julho seria porque neste período,

na região, não há ocorrências de chuvas e a temperatura é baixa, ocorrendo condições semelhantes para a região de Viçosa-MG.

A idade das folhas na planta pode ter influenciado nesta variação, pois, segundo Pereira et al. (2000), foi observado um maior teor de cumarina em folhas novas, próximas ao ápice do ramo. Isto pode ser devido ao tecido meristemático ser o local de síntese de cumarina em *Mikania glomerata* e, então translocada a outras partes da planta. As coletas consecutivas podem ter favorecido o desenvolvimento de folhas novas, contribuindo assim para o aumento no teor de cumarina ao longo do período.

A análise estatística dos resultados obtidos para o rendimento de cumarina, em função do tratamento de secagem, está apresentada na Tabela 2.

TABELA 2. Teor de cumarina em folhas de guaco, obtido em função de diferentes temperaturas do ar de secagem, comparado com a planta fresca (tratamento testemunha)

Temperatura do ar de secagem (°C)	Teor de cumarina (% base seca) ¹
70	0,5164 a
60	0,5104 a
50	0,4683 a
40	0,3366 b
Testemunha	0,3277 b
Ar ambiente	0,2725 bc
80	0,2155 c

¹ Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan CV= 13,58%.

Os resultados estão semelhantes aos obtidos por Pereira et al. (2000), que obtiveram maior rendimento de cumarina nas plantas secas a 50°C, inclusive superior ao encontrado no tratamento testemunha e o menor rendimento quando utilizaram a temperatura de 35°C. Concluíram que o conteúdo de cumarina é afetado pela eficiência do método de secagem, estando de acordo com outros trabalhos, demonstrando que altos níveis de drogas estão associados à secagem rápida. A observação de que a qualidade da droga presente na planta, freqüentemente, depende das condições de secagem pode ser explicada pela ação enzimática incontrollável e crescimento de microrganismos que podem ocorrer em plantas depois de colhidas, causando alterações químicas no tecido (Ming et al., 1996).

Portanto, a secagem das folhas de guaco, com o emprego das temperaturas de 50, 60 e 70°C para o ar de secagem, pode ter minimizado a ação enzimática e microbiana, evitando a degradação da cumarina. Os maiores teores obtidos podem ser devidos à ação da temperatura na estrutura da folha, possibilitando uma extração mais eficiente da cumarina pelo método empregado. Já para o tratamento de secagem com ar ambiente foi observada pequena redução no teor de cumarina, provavelmente devido ao longo tempo de secagem, beneficiando a ação enzimática e microbiana.

A redução drástica no teor de cumarina verificada para o tratamento de secagem com ar aquecido a 80°C pode ser devido a sua desnaturação, pois segundo Lake (1999), a cumarina é cristal sólido e branco, com temperatura de fusão na faixa de 68 a 70°C, visto que para o tratamento de secagem a 80°C a temperatura atingida na massa foi superior a 70°C.

CONCLUSÃO

Nas condições em que foi realizada a pesquisa, concluiu-se que:

O maior rendimento de cumarina foi obtido quando o processo de secagem foi realizado com temperatura entre 50 e 70°C;

A temperatura de 50°C para o ar de secagem possibilitou o melhor resultado para o rendimento extrativo de cumarina em folhas de guaco.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo suporte financeiro, essencial para a condução do trabalho.

REFERÊNCIA

ANDRADE, F.M.C. **Homeopatia no crescimento e na produção de cumarina em *Chambá justicia pectoralis* Jack**. 2000, 214p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
ASAE STANDARDS. **Standards engineering practices**

data: moisture measurement forages, ASAE S358.2 DEC99. Adopted and published by American Society of agricultural Engineers, 2000. p.565-72.

BARBOSA, F.F. et al. influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1221-5, 2006.

DAVID, E.F.S. et al. Influência da temperatura de secagem no rendimento e composição química do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.4, p.66-70, 2006.

KUSTER, R.M.; ROCHA, L.M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003. p.537-56

LAKE, B.G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: Relevance for human risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p.423-53, 1999.

LOW, T.; RODD, T.; BERESFORD, R. **Segredos e virtudes das plantas medicinais**. Rio de Janeiro: Editora Reader's Digest, 1999. 416p.

MING, L.C. et al. Yield of essential oil of and citral content in different parts of lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) Poaceae. **Acta Horticulturae**, v.1, n.426, p.555-9, 1996.

PANIZZA, S. **Plantas que curam: cheiro de mato**. São Paulo: IBRASA, 1997. p.117-8.

PEREIRA, A.M.S. et al. Seasonal variation in coumarin content of *Mikania glomerata*. **Journal of Herbs, Spices e Medicinal Plants**, v.7, n.2, p.1-10, 2000.

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, 90p. Dissertação (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

RADÜNZ, L.L. et al. Influência da temperatura do ar de secagem no rendimento do óleo essencial d hortelã-comum (*Mentha x villosa* Huds). **Engenharia na Agricultura**, v.14, n.4, p.250-7, 2006.

ROCHA, S.F.R.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M. Influência de cinco temperaturas de secagem no rendimento e composição do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, n.1, p.73-8, 2000.

SAEG - **Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

SOARES, R.D. et al. influência da temperatura e velocidade do ar na secagem de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) com relação aos teores de óleos essenciais e de linalol. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.4, p.1108-13, 2007.