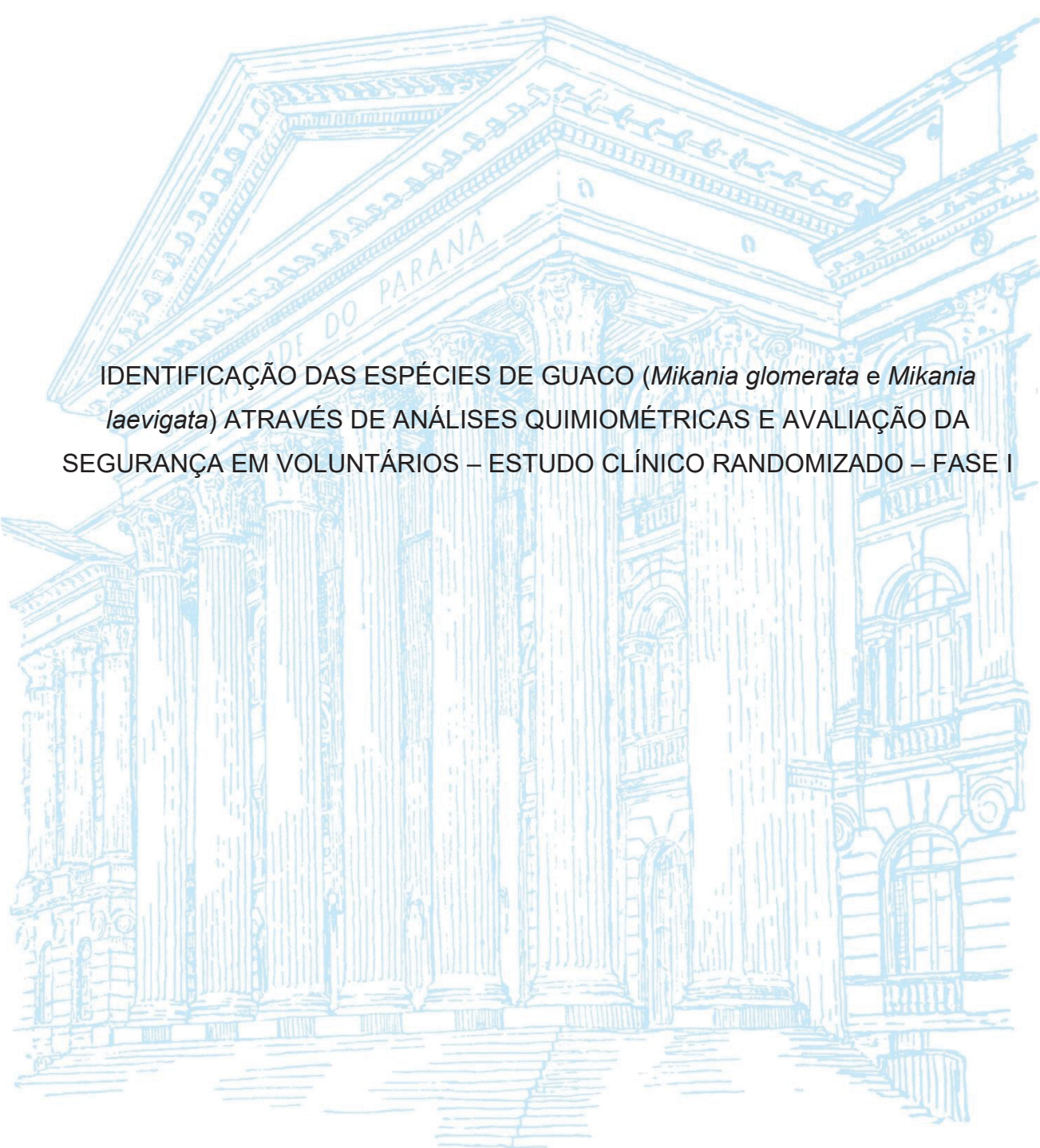


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO BERTOL



IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE GUACO (*Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*) ATRAVÉS DE ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS E AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA EM VOLUNTÁRIOS – ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO – FASE I

CURITIBA

2022

GUSTAVO BERTOL

IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE GUACO (*Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*) ATRAVÉS DE ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS E AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA EM VOLUNTÁRIOS – ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO – FASE I

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA

2022

Bertol, Gustavo

Identificação das espécies de guaco (*Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*) através de análises quimiométricas e avaliação da segurança em voluntários [recurso eletrônico] – estudo clínico randomizado fase I / Gustavo Bertol – Curitiba, 2022.

1 recurso online: PDF.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

1. *Mikania*. 2. Quimiometria. 3. Segurança. I. Pontarolo, Roberto. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 583.983



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **GUSTAVO BERTOL** intitulada: **IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE GUACO (*Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*) ATRAVÉS DE ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS E AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA EM VOLUNTÁRIOS - ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO - FASE I**, sob orientação do Prof. Dr. ROBERTO PONTAROLO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 08 de Julho de 2022.

ROBERTO PONTAROLO
Presidente da Banca Examinadora

RAQUEL DE OLIVEIRA VILHENA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

JANE MANFRON BUDEL
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

MICHEL LEANDRO DE CAMPOS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO)

Para Merilin, Sofia, Maisa e Lucas
por preencherem minha vida com amor.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho somente foi possível com a colaboração, suporte e auxílio de várias pessoas, dentre as quais as que são citadas a seguir, mas que não abrangem todas elas, que por limitação de espaço não são mencionadas, mas que nem por isso deixam de ser por mim lembradas.

Laerte Dall’Agnol e Aline R. C. Dall’Agnol Santin pelo incentivo e liberação para a execução do doutorado. Também para Ivonete Vieira Lins e Camila Heindrickson, todas da DALL Soluções, pelo auxílio nas análises cromatográficas.

Ao Dr. Ilio Montanari Junior e Dra. Vera Lucia Garcia ambos do CPQBA, pelo fornecimento das plantas e padrão de ácido caurenóico.

Ao Dr. Michael Schwarz do laboratório alemão PhytoLab pelo fornecimento de várias substâncias de referência, incentivo e amizade.

Ao colega do programa de pós-graduação Alexandre de Fátima Cobre pela amizade e auxílio fundamentais em várias das etapas do projeto.

Rodrigo Stori, Hellendy Fagundes Dambyski e Gabriela Luiza da Silva da empresa Laboran, por terem viabilizado a etapa clínica do trabalho meus sinceros agradecimentos.

A Elise Trento e Daniele Celupi do Herbarium Laboratório Botânico pelas contribuições, doação das matérias-primas e realização das análises microbiológicas.

Aos voluntários da pesquisa que embora não possam ser citados nominalmente tem o meu reconhecimento e gratidão por terem disponibilizado seu tempo ao presente trabalho.

Ao meu orientador Dr. Roberto Pontarolo por ter me dado a oportunidade da realização de um estudo clínico com plantas medicinais, além da serenidade e paciência nos desafios que se apresentaram ao longo do projeto.

Aos meus filhos, Sofia, Maisa e Lucas, que hoje não compreendem plenamente os desafios que envolveram este trabalho, mas que nunca deixaram de demonstrar carinho para seu pai.

Finalmente, para minha esposa Merilin que soube trilhar como uma verdadeira companheira os percalços inerentes a um projeto como este. Por ter me estendido a mão e muitas vezes me orientado quando as forças eram poucas, meu eterno agradecimento e reconhecimento por toda sua dedicação, compreensão e renúncia, somente você sabe tudo o que tivemos que superar juntos.

“Assim, é método e sabedoria para o crescimento infinito nunca lamentar o que não se tem, louvando-se a vida pelo de que se dispõe”.

Victor Hugo

RESUMO

Mikania glomerata e *Mikania laevigata* são plantas medicinais nativas da flora brasileira que possuem folhas similares macro e microscopicamente, sendo popularmente conhecidas como guaco. Suas folhas são utilizadas na medicina popular de forma intercambiável para o tratamento de várias enfermidades, com destaque para o uso do xarope das suas tinturas no tratamento de afecções do trato respiratório e broncodilatação. Apesar do largo uso popular e de ter sido incluído pelo Ministério da Saúde no elenco de referência de medicamentos na atenção básica em saúde, não existem estudos clínicos que demonstrem a segurança e eficácia das espécies de guaco. O marcador químico para o controle de qualidade e padronização do guaco é a cumarina, sendo a posologia recomendada pela ANVISA de 0,5 a 5,0 mg/dia. Entretanto, trabalhos recentes têm questionado a intercambiabilidade de uso e a cumarina como marcador para as duas espécies, isso porque foram observadas diferenças químicas e na atividade anti-inflamatória *in vivo* entre elas. Enquanto *M. laevigata* apresenta quantidades significativas de cumarina / ácido *o*-cumárico e baixa concentração de ácido clorogênico / ácido 3,5 dicafeoilquínico, o inverso é observado em *M. glomerata*. O presente trabalho apresenta um estudo clínico fase I para avaliação da segurança de soluções orais das duas espécies de guaco. Além disso, foram desenvolvidos modelos quimiométricos para os espectros no infravermelho próximo e médio do pó das folhas de guaco, guiados por análise em CLAE dos metabólitos secundários, para diferenciação das duas espécies. Os dados para os modelos quimiométricos foram pré-tratados por GLSW e avaliados por PCA, o modelo de separação foi obtido por PLS-DA. Os modelos por IV-próximo e IV-médio foram capazes de distinguir entre si as espécies de guaco, além de distinguir amostras de outras espécies vegetais, com adequada sensibilidade e seletividade. Com relação ao estudo clínico, pela primeira vez foi avaliada a segurança das espécies de guaco em humanos. Dezenove voluntários utilizaram separadamente durante duas semanas as soluções orais, com uma semana sem uso da medicação para a troca entre os grupos. Na primeira semana foram administrados 15 mL e na segunda semana 30 mL da solução, ambas duas vezes ao dia. A quantidade administrada de cumarina em cada semana foi respectivamente 0,11 e 0,21 mg/dia para *M. glomerata* e 3,60 e 7,20 mg/dia para *M. laevigata*. Foram monitorados nos voluntários eventos adversos relatados, parâmetros no sangue para os sistemas hematopoiético, hepático, renal e endócrino, além da pressão arterial. Todos os parâmetros foram comparados ao tempo inicial pela análise estatística de GEE. Para *M. glomerata* não houve relato de efeito adverso correlacionado ao seu uso, além da ausência de interferência estatisticamente significativa nos parâmetros monitorados. Já para *M. laevigata* foram obtidos resultados estatisticamente significativos para os parâmetros albumina, fosfatase alcalina, proteínas totais e ureia, o que sugere interferência na função hepática. Os resultados cromatográficos e quimiométricos demonstram que a cumarina não é um marcador adequado para *M. glomerata*, já no estudo clínico os medicamentos das duas espécies foram bem tolerados, sendo considerados seguros para uso humano.

Palavras-chave: *Mikania glomerata*; *Mikania laevigata*; identificação; quimiometria; estudo clínico; fase I; segurança.

ABSTRACT

Mikania glomerata and *Mikania laevigata* are medicinal plants natives of the Brazilian flora that have similar leaves macro and microscopically, being popularly known as guaco. Its leaves are used in folk medicine interchangeably for the treatment of various ailments, with emphasis on the use of syrup from its tinctures in the treatment of respiratory tract ailments and bronchodilation. Despite the wide popular use and being included by the Ministry of Health in the reference list of medicines in basic health care, there are no clinical trials that demonstrate the safety and efficacy of the species of guaco. The chemical marker for quality control and standardization of guaco is coumarin, and the recommended dosage by ANVISA is 0.5 to 5.0 mg/day. However, recent studies have questioned the interchangeability of use and coumarin as a marker for the two species. This is because chemical differences and *in vivo* anti-inflammatory activity have been observed between them. While *M. laevigata* presents significant amounts of coumarin / *o*-coumaric acid and low concentration of chlorogenic acid / 3,5-diffoilquinic acid, the opposite is observed in *M. glomerata*. The present work presents a phase I clinical trial to evaluate the safety of oral solutions of the two guaco species. In addition, chemometric models were developed for the near and mid-infrared spectra of guaco leaf powder, guided by CLAE analysis of secondary metabolites, for differentiation of the two species. The data for the chemometric models were pre-treated by GLSW and evaluated by PCA, the separation model was obtained by PLS-DA. The models by near-IR and mid-IR were able to distinguish guaco species from each other, in addition to distinguishing samples of other plant species, with adequate sensitivity and selectivity. Regarding the clinical study, for the first time the safety of the guaco species in humans was evaluated. Nineteen volunteers used the oral solutions separately for two weeks, with one week without medication for switching between groups. In the first week 15 mL and in the second week 30 mL of the solution were administered, both twice a day. The amount of coumarin administered in each week was 0.11 and 0.21 mg/day for *M. glomerata* and 3.60 and 7.20 mg/day for *M. laevigata*, respectively. Reported adverse events, blood parameters for the hematopoietic, hepatic, renal and endocrine systems, and blood pressure were monitored in the volunteers. All parameters were compared to the initial time by GEE statistical analysis. For *M. glomerata* there were no reports of adverse effects correlated to its use, besides the absence of statistically significant interference in the monitored parameters. For the *M. laevigata*, statistically significant results were obtained for the parameters albumin, alkaline phosphatase, total protein and urea, which suggests interference with liver function. The chromatographic and chemometric results demonstrate that coumarin is not a suitable marker for *M. glomerata*, whereas in the clinical study the drugs from both species were well tolerated and considered safe for human use.

Key words: *Mikania glomerata*; *Mikania laevigata*; identification; chemometrics; clinical trial; phase I; safety.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ASPECTO GERAL DE <i>M. laevigata</i> CULTIVADA EM CAMPO	21
FIGURA 2 – ASPECTO MORFOLÓGICO DE FOLHAS SECAS DAS ESPÉCIES DE GUACO	23
FIGURA 3 – PRINCIPAIS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ENCONTRADOS NO GUACO	30
FIGURA 4 – ETAPAS DO ESTUDO CLÍNICO	38
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE UM CONJUNTO DE DADOS TRIDIMENSIONAIS (X1, X2, X3) E SUAS COMPONENTES PRINCIPAIS (PC1, PC2),.....	53
FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS SEGUIDAS NA PESQUISA.....	57
FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DA PESQUISA CLÍNICA	68
FIGURA 8 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DE UMA AMOSTRA DE <i>M. laevigata</i> ..	78
FIGURA 9 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DE UMA AMOSTRA DE <i>M. glomerata</i>	79
FIGURA 10 – COMPARAÇÃO DOS TEORES DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ENTRE OS GRUPOS FORMADOS.....	86
FIGURA 11 – ESPECTROS IV-MÉDIO ANTES E APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM GLSW.....	88
FIGURA 12 – ESPECTROS IV-PRÓXIMO ANTES E APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM GLSW	90
FIGURA 13 – ANÁLISE EXPLORATÓRIA POR PCA PARA OS DADOS DE IV- MÉDIO	91
FIGURA 14 – ANÁLISE EXPLORATÓRIA POR PCA PARA OS DADOS DE IV- PRÓXIMO	92
FIGURA 15 – DEFINIÇÃO DO NÚMERO DE VL PARA PLS-DA IV-MÉDIO	94
FIGURA 16 – AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS ANÔMALAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO PLS-DA - IV-MÉDIO.....	95
FIGURA 17 – GRÁFICO DE ESCORES PLS-DA – IV-MÉDIO	97
FIGURA 18 – VIP ESCORES PARA MODELO IV-MÉDIO	98
FIGURA 19 – CURVAS ROC E GRÁFICO DE <i>THRESHOLD</i> PARA MODELO IV- MÉDIO	100
FIGURA 20 – DEFINIÇÃO DO NÚMERO DE VL PARA PLS-DA IV-PRÓXIMO.....	102

FIGURA 21 – AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS ANÔMALAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO PLS-DA - IV-PRÓXIMO.....	103
FIGURA 22 – GRÁFICO DE ESCORES PLS-DA – IV-PRÓXIMO.....	104
FIGURA 23 – VIP ESCORES PARA MODELO IV-PRÓXIMO.....	105
FIGURA 24 – CURVAS ROC E GRÁFICO DE <i>THRESHOLD</i> PARA MODELO IV-PRÓXIMO.....	107
FIGURA 25 – PERFIS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO GUACO.....	110
FIGURA 26 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS SOLUÇÕES ORAIS DE GUACO.....	111
FIGURA 27 – GRÁFICOS DE BARRA DE ERRO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS SEM EFEITO ASSOCIADO À SOLUÇÃO ORAL DE <i>M. glomerata</i> ...	123
FIGURA 28 – GRÁFICOS DE BARRA DE ERRO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS EFEITO ASSOCIADO À SOLUÇÃO ORAL DE <i>M. glomerata</i>	125
FIGURA 29 – GRÁFICOS DE BARRA DE ERRO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS SEM EFEITO ASSOCIADO À SOLUÇÃO ORAL DE <i>M. laevigata</i>	132
FIGURA 30 – ESTRUTURA QUÍMICA DA CUMARINA E AÇÃO ANTICOAGULANTE.....	134
FIGURA 31 – GRÁFICOS DE BARRA DE ERRO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS COM EFEITO ASSOCIADO À SOLUÇÃO ORAL DE <i>M. laevigata</i>	137

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>M. glomerata</i> E <i>M. laevigata</i>	20
QUADRO 2 – PRODUTOS TRADICIONAIS FITOTERÁPICOS DE GUACO REGISTRADOS NO BRASIL	27
QUADRO 3 – ESTUDOS DE SEGURANÇA DO GUACO	33
QUADRO 4 – RESULTADOS VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-DAD NA MATRIZ PÓ DAS FOLHAS DE GUACO	77
QUADRO 5 – RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-DAD NA MATRIZ SOLUÇÃO ORAL DE <i>M. laevigata</i>	108
QUADRO 6 – RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-DAD NA MATRIZ SOLUÇÃO ORAL DE <i>M. glomerata</i>	109
QUADRO 7 – PERFIL DOS VOLUNTÁRIOS DA PESQUISA.....	114
QUADRO 8 – EVENTOS ADVERSOS REPORTADOS SOLUÇÃO ORAL DE <i>M.</i> <i>glomerata</i>	116
QUADRO 9 – EVENTOS ADVERSOS REPORTADOS SOLUÇÃO ORAL DE <i>M.</i> <i>laevigata</i>	126

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – GRADIENTE UTILIZADO NA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA.....	59
TABELA 2 – FAIXA DOS PADRÕES PARA AS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	60
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES ORAIS UTILIZADAS NO ESTUDO CLÍNICO.....	65
TABELA 4 – RESULTADOS DE TEOR DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NAS AMOSTRAS COM IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E OUTRAS ESPÉCIES	81
TABELA 5 – RESULTADOS DE TEOR DAS AMOSTRAS ADQUIRIDAS NO COMÉRCIO	84
TABELA 6 – PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DO AJUSTE DO MODELO PLS-DA - IV-MÉDIO.....	99
TABELA 7 – PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DO AJUSTE DO MODELO PLS-DA - IV-PRÓXIMO.....	106
TABELA 8 – RESULTADOS DO CONTROLE DE QUALIDADE PARA AS SOLUÇÕES ORAIS	112
TABELA 9 – QUANTIDADES DIÁRIAS DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ADMINISTRADAS AOS VOLUNTÁRIOS.....	113
TABELA 10 – RESULTADOS CLÍNICOS SOLUÇÃO ORAL DE <i>M. glomerata</i>	117
TABELA 11 – DETALHAMENTO SOBRE OS PARÂMETROS CLÍNICOS QUE SOFRERAM EFEITO DO TEMPO – <i>M. glomerata</i>	121
TABELA 12 – RESULTADOS CLÍNICOS SOLUÇÃO ORAL DE <i>M. laevigata</i>	128
TABELA 13 – DETALHAMENTO SOBRE OS PARÂMETROS CLÍNICOS QUE SOFRERAM EFEITO DO TEMPO – <i>M. laevigata</i>	130

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALT	- Alanina aminotransferase
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	- <i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
AST	- Aspartato aminotransferase
β	- Diferença média entre tempos do estudo clínico
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CE ₅₀	- Concentração efetiva para metade do efeito máximo
CEP	- Comitê de ética em pesquisa
CLAE	- Cromatografia Líquida de alta eficiência
CNS	- Conselho Nacional de Saúde
CONEP	- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPQBA	- Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Químicas, Biológicas e Agrícolas
CV	- Coeficiente de variação
DAD	- Detector de arranjo de diodos
DL ₅₀	- Dose letal mediana
DNA	- <i>Deoxyribonucleic acid</i>
GEE	- <i>Generalized estimating equations</i>
GGT	- Gama glutamil transferase
GL	- Graus de liberdade
IC	- Intervalo de confiança
IFAV	- Insumo farmacêutico ativo vegetal
IV-médio	- Infravermelho médio
IV-próximo	- Infravermelho próximo
L	- Litros
LD	- Limite de detecção
LQ	- Limite de quantificação
min.	- Minutos
OMS	- Organização Mundial da Saúde
p	- Valor de p
PC	- Componente principal
PCA	- Análise de componentes principais

PLS-DA	- Análise discriminante por quadrados mínimos parciais
QIC	- Quasi-verossimilhança sob o modelo de independência
RENAME	- Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RMSECV	- Raiz da média quadrática de validação cruzada
RNI	- Razão Normalizada Internacional (tempo de protrombina)
ROC	- Características de operação do receptor
σ	- Desvio padrão
$\sigma_{\bar{x}}$	- Erro padrão da média
Σ	- Somatório de números
S/R	- Razão sinal / ruído de um sinal analítico
SUS	- Sistema Único de Saúde
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido
UNICAMP	- Universidade Estadual de Campinas
VIP	- Variável importante na projeção
VL	- Variável latente
\bar{x}	- Média
χ^2	- Qui-quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 GUACO	20
3.1.1 Propriedades farmacológicas e constituintes químicos do guaco	25
3.1.2 Segurança do guaco	33
3.2 ESTUDOS CLÍNICOS	37
3.2.1 Estudos clínicos e fitoterápicos	43
3.3 QUIMIOMETRIA E IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS	47
3.3.1 Análise de Componentes Principais – PCA	52
3.3.2 Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais – PLS-DA	54
4 MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL	57
4.2 AMOSTRAS VEGETAIS	58
4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS VEGETAIS	58
4.4 CONSTRUÇÃO DO MODELO QUIMIOMÉTRICO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE GUACO	59
4.4.1 Padrões analíticos e reagentes para análise cromatográfica	59
4.4.2 Análise por CLAE do pó das plantas e validação do método analítico	59
4.4.3 Análise dos dados de teor para orientação do modelo quimiométrico	60
4.4.4 Análise por infravermelho das amostras de guaco	61
4.4.5 Construção dos modelos quimiométricos para reconhecimento de padrões / identificação das espécies	62
4.5 MATERIAIS PARA O ESTUDO CLÍNICO	64
4.5.1 Matérias-primas utilizadas na produção das tinturas e soluções orais	64
4.5.2 Obtenção das tinturas de guaco	64
4.5.3 Obtenção das soluções orais	64
4.5.4 Análise por CLAE das tinturas, soluções orais e validação do método analítico	65
4.6 ESTUDO CLÍNICO	65

4.6.1	Seleção dos voluntários.....	66
4.6.2	Desenho do estudo clínico	67
4.6.3	Monitoramento da segurança do guaco	70
4.6.4	Avaliação dos eventos adversos	71
4.6.5	Avaliação e tratamento dos dados de pressão arterial e análises do sangue dos voluntários	72
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1	CONSTRUÇÃO DO MODELO QUIMIOMÉTRICO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE GUACO	75
5.1.1	Validação do método analítico para o teor dos metabólitos secundários nas amostras de guaco	75
5.1.2	Resultados de teor dos metabólitos secundários nas amostras de guaco	78
5.1.3	Análise exploratória por PCA para os espectros no infravermelho	87
5.1.4	Modelo PLS-DA para identificação das espécies de guaco por IV-médio	93
5.1.5	Modelo PLS-DA para identificação das espécies de guaco por IV-próximo	101
5.2	ESTUDO CLÍNICO FASE I	107
5.2.1	Validação do método analítico para o teor dos metabólitos secundários nas soluções orais de guaco	107
5.2.2	Resultados de controle de qualidade para as soluções orais	112
5.2.3	Perfil dos voluntários selecionados para o estudo	114
5.2.4	Avaliação da segurança de <i>M. glomerata</i>	115
5.2.5	Avaliação da segurança de <i>M. laevigata</i>	126
6	CONCLUSÃO.....	140
	REFERÊNCIAS.....	142
	ANEXOS.....	153

1 INTRODUÇÃO

Guaco é o nome popular utilizado para designar duas espécies de plantas medicinais bastante difundidas na medicina tradicional brasileira, *Mikania glomerata* Spreng. e *Mikania laevigata* Sch.Bip. ex Baker. Outros nomes comuns são guaco-liso, guaco-cheiroso, guaco-do-mato, cipó-caatinga e uaco.

As duas espécies são endêmicas da América do Sul cobrindo extensas áreas do Paraguai, Argentina e Brasil, neste último ocorrendo principalmente no interior e bordas das áreas originalmente ocupadas pelo bioma Mata Atlântica, entre os estados do Rio Grande do Sul e Bahia. Essa característica faz com que as infusões em água das folhas dessas espécies botânicas sejam utilizadas, ao longo de todo o território brasileiro, na forma pura de chá ou misturadas com mel na forma de xarope, bem como o macerado hidroalcoólico para o tratamento de diferentes enfermidades, com destaque para o uso em afecções do trato respiratório e broncodilatação (GASPARETTO *et al.*, 2010).

Esse uso tradicional do guaco associado às propriedades terapêuticas alegadas fez com que o Ministério da Saúde incluísse o xarope e a solução oral de *M. glomerata* no elenco de referência de medicamentos e insumos complementares para a assistência farmacêutica na atenção básica em saúde, conforme anexo II da Portaria No. 3.237 de 24 de 2007, sendo que os produtos à base de guaco vem sendo mantidos na lista de produtos estratégicos para o Sistema Único de Saúde desde então (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007, 2017, 2022). Logo, produtos tradicionais fitoterápicos à base de guaco vêm sendo adquiridos pelo poder público e distribuídos para a população nos municípios brasileiros que incorporaram o medicamento à sua lista de produtos estratégicos.

Somado a isso, atualmente os produtos fitoterápicos de guaco possuem o maior número de registros na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em relação aos produtos registrados da flora nacional, dezenove registros válidos de dezesseis detentores de registros até o final de 2021. Todos são declarados como utilizando *M. glomerata* com diferenças na concentração de cumarina, que é tida como o marcador químico das duas espécies, sendo que na sua totalidade são registrados como medicamentos tradicionais fitoterápicos, o que permite que não seja necessário que as empresas apresentem estudos clínicos para comprovação da

segurança e eficácia do medicamento para obtenção do registro, por se entender que estas foram demonstradas através da tradicionalidade do uso da espécie vegetal ao longo de vários anos (BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014a). Consequentemente, tanto a academia quando a indústria não promoveram até o momento estudos clínicos com a finalidade de avaliar de forma confiável a segurança e eficácia dos produtos fitoterápicos das duas espécies de guaco (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

A ausência desses estudos é contrária ao guia da OMS - Instruções operacionais: Informações necessárias para a condução de ensaios clínicos com fitoterápicos, que descreve que a ampla utilização dos medicamentos fitoterápicos pela população sugere, mas não assegura, que os medicamentos tradicionais apresentam uma relação risco-benefício favorável (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Como exemplo pode ser citado o caso do *Hypericum perforatum* L., que tem a infusão das flores secas utilizadas na Europa central para o tratamento de distúrbios do sistema nervoso como depressão e ansiedade. Uma revisão sistemática conduzida por Stevinson e Ernst (2004) sobre as evidências clínicas disponíveis para a espécie citada encontrou relatos de casos que levantam a possibilidade de que o seu extrato possa desencadear episódios de mania em pacientes vulneráveis, o que precisa ser comprovado através de estudos clínicos.

Além disso, o baixo número de estudos clínicos com plantas medicinais é tido como um dos motivos de dificuldade para a disseminação da fitoterapia no Brasil, uma vez que são escassos os dados disponíveis sobre segurança e eficácia em humanos para as plantas medicinais da flora nacional, dados esses essenciais para direcionar os profissionais da saúde na orientação da população para o uso racional desses medicamentos (LEITE; CAMARGOS; CASTILHO, 2021). Desta forma, persiste a necessidade de avaliar os reais benefícios e os possíveis riscos apresentados para o guaco através da realização de ensaios clínicos conduzidos em conformidade com os princípios da ciência clínica atualmente praticada.

No que diz respeito ao controle de qualidade das espécies vegetais, desde a farmacopeia brasileira 1ª edição *M. glomerata* possui uma monografia, sendo que a espécie *M. leavigata* foi incorporada ao compêndio farmacêutico nacional em 2005 na 4ª edição da farmacopeia. Entretanto, a partir dessa edição a monografia de *M. glomerata* deixou de ser incorporada à farmacopeia, sendo mantida apenas a última espécie de guaco nessa e nas edições posteriores. Isso porque as duas espécies de

guaco guardam entre si uma similaridade morfológica muito grande, além de características microscópicas foliares muito parecidas. Além disso, considerando algumas sequências de DNA estudadas, até o momento não foram encontradas diferenças moleculares entre as espécies (BASTOS *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2020). Isso tem tornado a discriminação das espécies de guaco controversa e como consequência ambas têm sido preparadas, comercializadas e utilizadas de forma indistinta (DE MELO; SAWAYA, 2015), suscitando a comunidade científica a uma discussão em torno do tema.

Entretanto, o uso indistinto das espécies praticado e permitido pela ANVISA através da Instrução Normativa nº 2 de 2014 e da 2ª edição do formulário de fitoterápicos da farmacopeia brasileira não é uma situação adequada (BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014a; BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2021). Isso porque, atualmente existem diferenças reportadas na composição do metabolismo secundário entre as espécies de guaco, além de ações farmacológicas com resultados superiores da atividade anti-inflamatória de *M. laevigata* em relação à *M. glomerata* nos modelos *in vivo* estudados (ALMEIDA *et al.*, 2017; BERTOLUCCI *et al.*, 2013a; DELLA PASQUA *et al.*, 2019; DE MELO; FREITAS *et al.*, 2008; SAWAYA, 2015; VIEIRA *et al.*, 2020).

Conseqüentemente, o uso de fitoterápicos sem comprovação de segurança e eficácia pode ser prejudicial para o tratamento e controle de doenças, o que torna imprescindível a condução de estudos clínicos para a garantia dos benefícios desses medicamentos.

Finalmente, tanto o governo, quanto a população brasileira vem alocando recursos financeiros consideráveis no financiamento e obtenção respectivamente de fitoterápicos de guaco para profilaxia de doenças como a asma. Logo, essa situação exige a correta identificação das espécies botânicas e que estudos clínicos sejam conduzidos utilizando exemplares confiáveis com o objetivo de se avaliar corretamente a segurança e eficácia em humanos a fim de se orientar qual das espécies de guaco é a mais adequada para a finalidade terapêutica pretendida. O primeiro passo é atestar a segurança clínica, para que, caso alguma das espécies seja considerada não segura, a sua utilização pela população seja desencorajada e proibido o registro / comercialização de produtos da espécie, e posteriormente sejam realizados estudos clínicos de eficácia com as espécies que tenham tido a sua segurança comprovada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Construir modelo quimiométrico para diferenciação das espécies de guaco e conduzir estudo clínico de fase I para avaliar a segurança de soluções orais de *M. glomerata* e *M. laevigata* em voluntários através do monitoramento de marcadores do sangue e avaliação clínica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir modelo quimiométrico utilizando as técnicas analíticas de cromatografia líquida de alto desempenho (CLAE), infravermelho próximo (IV-próximo) e infravermelho médio (IV-médio) para diferenciação entre as espécies *M. glomerata* e *M. laevigata*;
- Administrar aos voluntários solução oral de *M. glomerata* e solução oral de *M. laevigata*, acompanhar clinicamente os indivíduos e monitorar marcadores do sangue em ambos os grupos;
- Determinar se alguma das duas espécies de guaco (*M. glomerata* e *M. laevigata*) apresenta efeitos tóxicos no organismo humano, comparando-se estatisticamente os resultados dos exames laboratoriais e clínico antes e depois do uso de cada uma dessas soluções orais de guaco;
- Determinar através de marcador inflamatório no sangue dos indivíduos se alguma das duas espécies apresenta indício de ação anti-inflamatória para orientação de um possível estudo clínico de fase II.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 GUACO

Guaco é nome popular comumente empregado para designar as espécies de plantas medicinais, *Mikania glomerata* Spreng. e *Mikania laevigata* Sch.Bip. ex Baker, ambas pertencentes à família Asteraceae e que seguem a classificação taxonômica apresentada no QUADRO 1.

QUADRO 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *M. glomerata* E *M. laevigata*.

CATEGORIA TAXONÔMICA	<i>M. glomerata</i> ^a	<i>M. laevigata</i> ^b
Filo	Tracheophyta	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Ordem	Asterales	Asterales
Família	Asteraceae	Asteraceae
Tribo	Eupatorieae	Eupatorieae
Gênero	<i>Mikania</i>	<i>Mikania</i>
Espécie	<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	<i>Mikania laevigata</i> Sch.Bip. ex Baker

FONTE: RITTER *et al.* (2022a, 2022b)

O gênero *Mikania* compreende aproximadamente 439 espécies, distribuídas principalmente nas regiões neotropicais (ROYAL BOTANICAL GARDENS, 2022a). No Brasil, são encontradas cerca de 199 espécies que estão amplamente distribuídas em todas as regiões do Brasil (RITTER *et al.*, 2022c).

Várias das espécies pertencentes ao gênero *Mikania* são medicinais, sendo que duas das principais são *M. glomerata* e *M. laevigata*, largamente utilizadas pela população brasileira. Ambas ocorrem no Brasil principalmente no bioma Mata Atlântica, crescendo desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul, além de serem encontradas no Paraguai e noroeste da Argentina, além de porções da América Central no caso específico de *M. glomerata* (ROYAL BOTANICAL GARDENS, 2022b).

As duas espécies são lianas, de grande porte e perenes. Apresentam-se como subarbusto silvestre, escandente, com folhagem densa e perene. O caule é descrito como cilíndrico, ramificado, glabro e, quando seco, apresenta fratura fibrosa e aspecto estriado no sentido longitudinal. As plantas jovens apresentam coloração verde-clara passando a verde-escura e a cinzento-escura nas partes suberificadas, FIGURA 1 (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

FIGURA 1 – ASPECTO GERAL DE *M. laevigata* CULTIVADA EM CAMPO

FONTE: O autor (2022)

NOTA: A – Aspecto geral do crescimento; B – Aproximação das folhas.

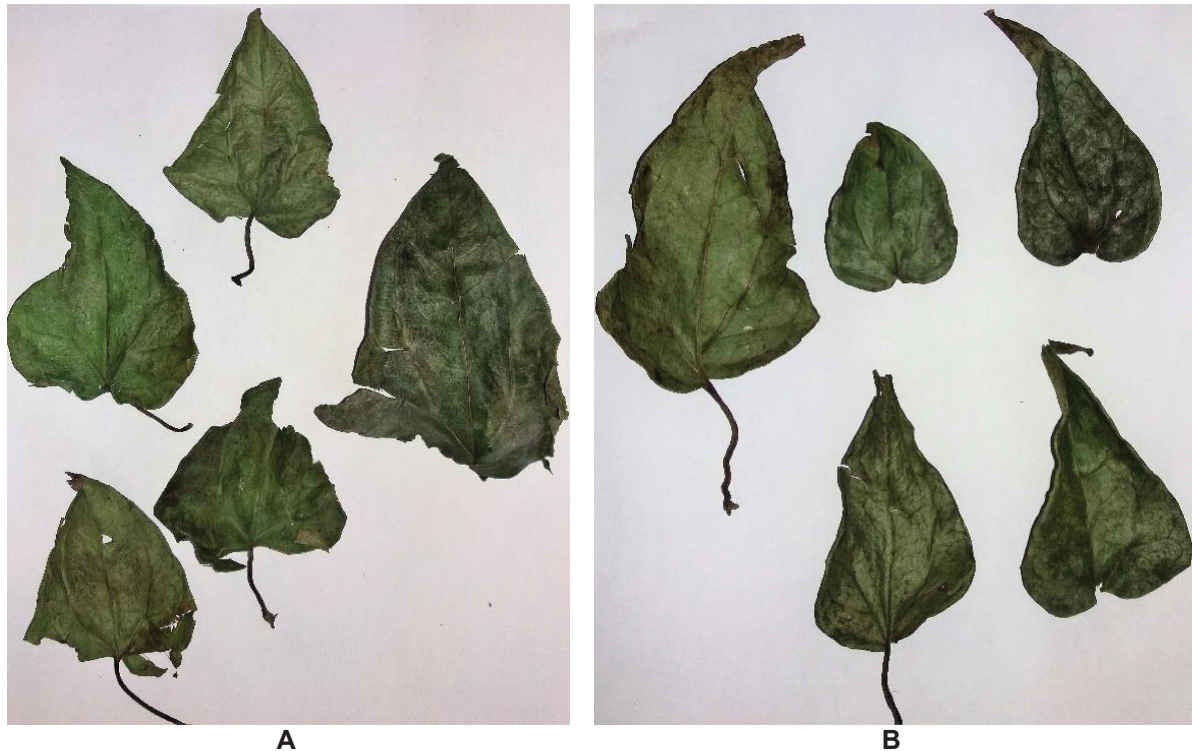
Segundo Ritter e Miotto (2005), *M. glomerata* floresce e frutifica entre agosto e dezembro, enquanto *M. laevigata* entre agosto e novembro. Já outros autores descrevem a floração de cada uma das espécies em momentos diferentes, final de

julho até meados de agosto e final de agosto até meados de setembro são os meses descritos por Almeida e colaboradores (2017) e Costa e colaboradores (2018), bem como janeiro e setembro por Napimoga e Yatsuda (2010), respectivamente para *M. glomerata* e *M. laevigata*.

As folhas das duas espécies, parte da planta utilizada para fins medicinais, tiveram sua anatomia macro e microscópica descrita por diferentes autores nos últimos anos (BUDEL *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2018; DE ALMEIDA *et al.*, 2017). Além disso, possuem monografias em diferentes edições da farmacopeia brasileira, as folhas de *M. glomerata* foram oficializadas na primeira edição da referida farmacopeia, enquanto as folhas de *M. laevigata* apareceram na quarta edição e foram mantidas nas edições subsequentes, figurando na sexta edição publicada no ano de 2019. Ambas são descritas macroscopicamente como pecioladas, oval-lanceoladas, glabras, de ápice de agudo à acuminado, podendo medir de 10 a 15 cm de comprimento. Possuem margem inteira à sinuosa, glabra e lúzida, sobre ambas as faces, sensivelmente lobada, com a base arredondada. Com relação às nervuras, são tri ou pentanervadas, oriundas do ápice do pecíolo, que mede de 3 a 6 cm de comprimento, por até, 0,5 cm de diâmetro na base (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Embora exista uma semelhança bastante grande entre suas folhas (FIGURA 2), Costa e colaboradores (2018) descrevem que a presença de quatro lóbulos nas folhas adultas de *M. glomerata* é uma das características que distinguem as espécies. O acompanhamento do desenvolvimento das folhas no campo permite verificar a expansão dos lóbulos das folhas jovens para as folhas maduras, enquanto em folhas jovens de *M. laevigata* nenhum lóbulo está presente. Segundo os autores, essas características são mantidas para espécimes que crescem sob exposição plena ao sol. Entretanto, quando os mesmos espécimes crescem em ambientes sombreados, como em estufas, a lâmina foliar sofre mudanças e não é mais possível a distinção das duas espécies através da morfologia. Mesmo características marcantes, como o odor adocicado das folhas de *M. laevigata* é perdido nestas condições. Essa modificação foi comprovada quando os pesquisadores transferiram uma amostra cultivada em condição de sol pleno, identificada como *M. laevigata*, para uma estufa e passaram a observar o desenvolvimento de novas folhas com lobos característicos de *M. glomerata*. Conseqüentemente, a identificação baseada na morfologia das folhas pode levar a erros caso a amostra cresça em condições de sombra.

FIGURA 2 – ASPECTO MORFOLÓGICO DE FOLHAS SECAS DAS ESPÉCIES DE GUACO



FONTE: O autor (2022)
 NOTA: A – *M. glomerata*; B – *M. laevigata*.

Microscopicamente as folhas são descritas como bastante semelhantes. Próximo à lâmina foliar poucos estômatos e tricomas glandulares unisseriados estão presentes principalmente na face abaxial. Nas lâminas foliares das duas espécies são encontradas ceras epicuticulares, em ambas as superfícies. Em depressões da epiderme existem tricomas glandulares unisseriados e pluricelulares, além de tricomas glandulares capitados. A folha de ambas as espécies é anfiestomática, apresentando estômatos anomocíticos e anisocíticos, mais numerosos na face abaxial. A epiderme da nervura central é unisseriada com células arredondadas. Nessa região, subjacente à epiderme, estão presentes aproximadamente quatro camadas de colênquima angular na face adaxial e três camadas na face abaxial (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2018; COSTA *et al.*, 2018).

A epiderme da face adaxial é unisseriada e, subjacente a hipoderme, evidencia células parenquimáticas alongadas periclinalmente e sem cloroplastos. O mesofilo dorsiventral possui duas a três camadas de parênquima paliçádico na face adaxial e sete a doze camadas de parênquima esponjoso na face abaxial (COSTA *et al.*, 2018).

Essas características microscópicas semelhantes entre as duas espécies fez com que alguns autores tenham descrito como de difícil diferenciação *M. glomerata* e *M. laevigata*, com um trabalho sugerindo unificação taxonômica das espécies por não terem sido encontradas diferenças anatômicas e moleculares na sequência de DNA utilizada no estudo realizado (BASTOS *et al.*, 2011). Entretanto, trabalhos recentes tem apontado diferenças significativas no metabolismo secundário entre as espécies, sugerindo que a classificação taxonômica distinta deve ser mantida, um desses trabalhos realizado por Costa e colaboradores (2018) encontrou apenas 3 diferenças microscópicas entre as duas espécies após análises das folhas e pecíolos:

- 1) Colênquima do pecíolo – *M. glomerata* possui colênquima angular enquanto *M. laevigata* possui colênquima lamelar;
- 2) Parênquima paliçádico das folhas – em *M. laevigata* as camadas de células dessa estrutura apresentam uma maior frequência de paredes indentadas periclinalmente em relação a *M. glomerata*;
- 3) Compostos fenólicos no colênquima da nervura central – foram observados compostos fenólicos corados com cloreto férrico em *M. glomerata*, porém estes não foram observados na nervura central de *M. laevigata*.

Os autores discutem que mesmo que essas três diferenças tenham sido encontradas, apenas a primeira seria mais confiável, embora a Farmacopeia Brasileira V descreva a presença de colênquima angular no pecíolo de *M. laevigata*. As outras duas diferenças são bastante sutis, particularmente a terceira depende da espessura do corte histológico realizado e não foi observada em material desidratado. Logo, segundo os autores citados, a melhor forma de diferenciação das duas espécies para fins de controle de qualidade seria a análise química dos metabólitos secundários e a avaliação morfológica das plantas crescidas no campo, o que não pode ser realizado em indivíduos cultivados em estufa, uma vez que estes perdem suas características morfológicas conforme descrito no trabalho. Além dessas características, o odor doce característico da cumarina auxilia na diferenciação das espécies, considerando que apenas em *M. laevigata* este odor é sentido e permanece até no material vegetal seco (RITTER; MIOTTO, 2005).

Conseqüentemente, vários são os motivos que podem justificar a confusão na identificação das duas espécies, como por exemplo: espécimes para identificação

botânica coletados de forma inadequada, possuindo apenas folhas jovens, ainda não devidamente diferenciadas, próximo às inflorescências (RITTER; MIOTTO, 2005); em algumas condições cromatográficas de métodos pouco seletivos os tempos de retenção da molécula de cumarina (marcador de controle de qualidade do guaco) é muito próximo ao das moléculas dos derivados do ácido cafeoilquínico (metabólitos secundários do guaco), podendo haver coeluição dos picos e ser tomada uma molécula pela outra (ALMEIDA *et al.*, 2017); o uso indevido de hastes foliares misturados com as folhas, elevando a quantidade de cumarina no material utilizado, uma vez que os ramos das duas espécies possuem quantidades similares de cumarina (COSTA *et al.*, 2018).

O primeiro motivo apresentado não permite a correta identificação das folhas adultas das duas espécies, folhas essas que apresentam maior diferenciação em relação às folhas jovens. Já os dois últimos motivos têm como consequência conduzir à falsa conclusão de que as duas espécies possuem a mesma composição química em relação aos seus principais metabólitos secundários. Logo, os três motivos apresentados inviabilizam a correta identificação das espécies vegetais através das principais características indicadas no trabalho de Costa e colaboradores (2018), sendo que a importância da análise dos marcadores químicos das espécies para fins de identificação é reiterada por Vieira e colaboradores (2020), principalmente para o caso de folhas em estágio jovem ou em folhas trituradas. Esses fatos associados fazem com que muitas vezes as espécies de guaco sejam utilizadas de forma intercambiável e algumas vezes sem distinção entre elas (NAPIMOGA; YATSUDA, 2010).

3.1.1 Propriedades farmacológicas e constituintes químicos do guaco

Na medicina tradicional, o guaco vem sendo utilizado para o tratamento de diversas afecções em que sejam benéficas suas propriedades excitante, tônica, depurativa, antipirética, antiofídica, antimalárica e estimulante do apetite. O guaco também é utilizado contra picada de escorpião, artrite, reumatismo, eczema pruriginoso, inflamação da garganta e principalmente para o tratamento de doenças respiratórias, atuando como antiespasmódico, balsâmico e expectorante (BOTSARIS, 2007; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; GASPARETTO *et al.*, 2010;

MAIORANO *et al.*, 2005). Em virtude dessas atribuições, diversos produtos à base de guaco vêm sendo desenvolvidos e comercializados no Brasil e, em especial, o xarope de guaco está instituído no elenco de referência de medicamentos da rede de atenção básica em saúde, conforme descrito no anexo II da Portaria nº 2.982 de 26 de novembro de 2009 (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Além de constar na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Dessa forma, o xarope de guaco é utilizado em larga escala pela população brasileira através de diversos programas de fitoterapia disseminados em todo o Brasil (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; GASPARETTO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2006).

No QUADRO 2 são apresentados os registros válidos na ANVISA até o final de 2021 dos produtos fitoterápicos a base de guaco. No quadro é possível constatar a diferença existente tanto na concentração do marcador cumarina, quanto da posologia recomendada entre os produtos disponíveis no mercado. Além disso, fica evidente que apenas um dos produtos registrados no mercado cita a espécie *M. laevigata* em sua composição, enquanto todos os demais declaram utilizar apenas a espécie *M. glomerata*.

QUADRO 2 – PRODUTOS TRADICIONAIS FITOTERÁPICOS DE GUACO REGISTRADOS NO BRASIL

(continua)

PRODUTO	EMPRESA	REGISTRO	ESPÉCIE	CUMARINA (mg/mL)	POSOLOGIA (mL) / DIA*	DURAÇÃO	CUMARINA (mg/dia)
Apiguaco	Apis Flora Industrial e Comercial Ltda.	121070009	<i>M. glomerata</i>	0,146	10 - 3 x	1 a 2 semanas	4,38
Biotoss edulito	Bionatus Laboratório Botânico Ltda.	120090031	<i>M. glomerata</i>	0,036	10 - 3 x	1 a 2 semanas	1,08
Biotoss xarope	Bionatus Laboratório Botânico Ltda.	120090032	<i>M. glomerata</i>	0,036	10 - 3 x	1 a 2 semanas	1,08
Expectrat	Cazi Química Farmacêutica Indústria e Comercio Ltda.	107150177	<i>M. glomerata</i>	-	5 - 3 x	1 a 2 semanas	-
G500 balsâmico	Laboratório Catarinense Ltda.	100663393	<i>M. glomerata</i>	0,035	5 - 8 x	1 a 2 semanas	1,40
Guaco edulito Herbarium	Herbarium Laboratório Botânico Ltda.	118600078	<i>M. glomerata</i>	0,30	5 - 3 x	1 a 2 semanas	4,50
Guacoflus	Airela Indústria Farmacêutica Ltda.	144930059	<i>M. glomerata</i>	0,08	15 - 4 x	1 a 2 semanas	4,80
Guacolin	Kress Farmacêutica S.A.	106570016	<i>M. glomerata</i>	0,05	15 - 3 x	1 a 2 semanas	2,25
Guaconat	Pharmascience Indústria Farmacêutica S.A.	117170057	<i>M. glomerata</i>	-	15 - 3 x	1 a 2 semanas	-
Guacotoss	Ifal Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos Ltda.	135310033	<i>M. glomerata</i>	0,03	15 - 3 x	1 a 2 semanas	1,35
Guacovita	Laboratório Vitalab Ltda.	154000036	Associação de <i>M. glomerata</i> , <i>Aconitum napellus</i> , <i>Cephaelis ipecacuanha</i> , <i>Myroxylon balsamum</i> , <i>Nasturtium officinale</i> e <i>Polygala senega</i>	0,025	15 - 8 x	5 dias	3,00

QUADRO 2 – PRODUTOS TRADICIONAIS FITOTERÁPICOS DE GUACO REGISTRADOS NO BRASIL

PRODUTO	EMPRESA	REGISTRO	ESPÉCIE	CUMARINA (mg/mL)	POSOLOGIA (mL) / DIA*	DURAÇÃO	CUMARINA (mg/dia)
Livtós	Vidora farmacêutica Ltda.	104730039	<i>M. glomerata</i>	0,0576	10 - 3 x	1 a 2 semanas	1,73
Melagrião	Laboratorio Catarinense Ltda.	100660055	Associação de <i>M. glomerata</i> , <i>Cephaelis ipecacuanha</i> e <i>Polygala senega</i>	0,025	15 - 8 x	5 dias	3,00
Peitoral Martel	Kley Hertz Farmacêutica S.A.	106890148	<i>M. glomerata</i>	0,0352	15 - 3 x	1 a 2 semanas	1,58
Xarope de guaco Belfar	Belfar Ltda.	105710144	<i>M. glomerata</i>	0,035	10 - 3 x	1 a 2 semanas	1,05
Xarope de guaco Cimed	Cimed Indústria S.A.	143810211	<i>M. glomerata</i> e <i>M. laevigata</i>	0,0831	10 - 3 x	1 a 2 semanas	2,50
Xarope de guaco Herbarium	Herbarium Laboratório Botânico Ltda.	118600039	<i>M. glomerata</i>	0,035	15 - 3 x	1 a 2 semanas	0,53
Xarope de guaco Natulab	Natulab Laboratório S.A.	138410032	<i>M. glomerata</i>	0,02625	15 - 3 x	1 a 2 semanas	1,18
Xarope guaco Melpoejo	Laboratório Melpoejo	105340005	<i>M. glomerata</i>	0,06	5 - 4 x	1 a 2 semanas	1,20

NOTA: *Considerada a posologia recomendada para adultos.

LEGENDA: “-” – informação não disponível.

Os efeitos benéficos do guaco são atribuídos principalmente à cumarina (1,2-benzopirona), que é definida pela ANVISA como o marcador químico das duas espécies conhecidas como guaco. Ainda segundo a ANVISA, a dose diária da cumarina pode variar entre 0,5 a 5,0 mg (BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014a). Dentre as principais propriedades terapêuticas da cumarina, destaca-se o efeito relaxante observado em traqueia de porquinho-da-índia pré-contraída com histamina ($CE_{50} = 35,0 \mu\text{g/mL}$) ou carbacol ($CE_{50} = 33,4 \mu\text{g/mL}$). Nesses animais, a cumarina também promoveu *in vivo* resistência contra a histamina inalada através de dose adequada média de 75 mg/kg. Esses resultados sugerem a possibilidade de efeito broncodilatador da cumarina em inflamações das vias aéreas superiores (RAMANITRAHASIMBOLA *et al.*, 2005).

O uso da cumarina é reportado de longa data, e por esse motivo, diversos estudos foram conduzidos com o objetivo de compreender o seu comportamento no organismo (COHEN, 1979). No metabolismo de primeira passagem (Fase I) a cumarina é rapidamente convertida em 7-hidroxicumarina através de um citocromo P450 específico (CYP2A6). A 7-hidroxicumarina é considerada o principal metabólito *in vivo* da cumarina, e alguns estudos apontam que essa substância é o fármaco efetivo, enquanto sua precursora, a cumarina, apenas um pró-fármaco (HOULT; PAYÁ, 1996). Dentre as principais atividades da 7-hidroxicumarina pode ser citada a atenuação de processos inflamatórios alérgicos das vias aéreas superiores de camundongos (60 mg/kg), com a redução significativa do número de neutrófilos e eosinófilos, produção de muco e níveis de citocinas mediadores da inflamação no fluido de lavagem bronco-alveolar e pulmões dos animais (GASPARETTO *et al.*, 2015; LACY; O'KENNEDY, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2009).

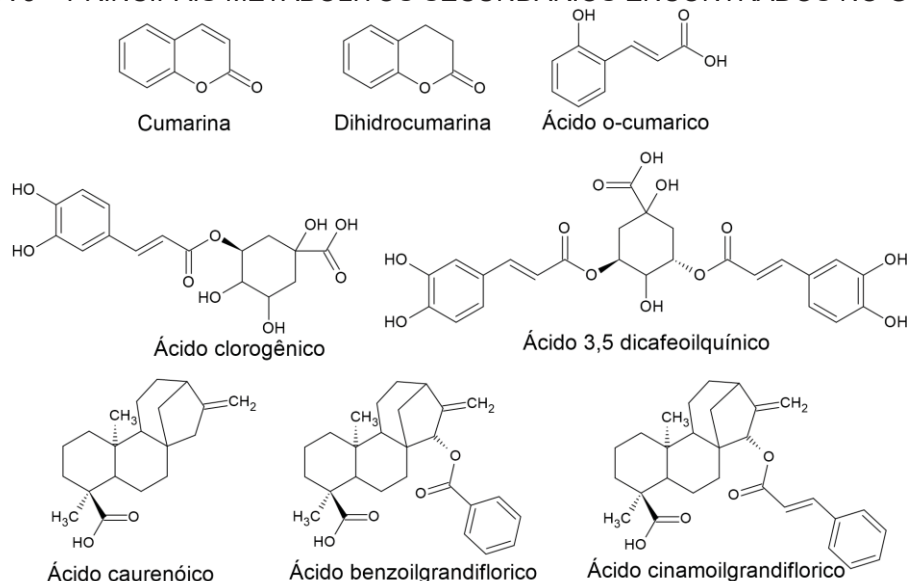
Recentemente, Gasparetto e colaboradores realizaram um estudo farmacocinético da cumarina e da 7-hidroxicumarina em humanos. Este estudo levou à conclusão que a administração do xarope de guaco, na posologia do medicamento estudado (5 mL, 3 vezes ao dia), não proporciona níveis plasmáticos suficientes de cumarina e 7-hidroxicumarina para que isoladamente possam promover o efeito broncodilatador (GASPARETTO, 2013). Outro estudo promovido por Garcia e colaboradores demonstrou que o uso do xarope em doses únicas não foi capaz de causar broncodilatação em indivíduos asmáticos (GARCIA *et al.*, 2020). Entretanto, nenhum dos dois estudos citados anteriormente administrou para os voluntários da pesquisa altas concentrações de guaco por um período prolongado de tempo, por

exemplo 14 dias, para avaliar eventuais efeitos de doses acumuladas no organismo humano.

Em adição ao exposto acima, alguns grupos de pesquisa têm questionado a possibilidade do uso indiscriminado das duas espécies para a mesma finalidade terapêutica, uma vez que vem sendo relatadas diferenças qualitativas e quantitativas nos metabólitos secundários produzidos por cada uma dessas espécies. Desta forma, outros metabólitos secundários teriam relevância para diferenciação entre as duas espécies de *Mikania*, bem como poderiam ter um efeito sinérgico com a cumarina para explicar os efeitos farmacológicos reportados para o guaco (ALMEIDA *et al.*, 2017; BERTOLUCCI *et al.*, 2013a; VIEIRA *et al.*, 2020).

Segundo esses trabalhos, as análises cromatográficas de *M. glomerata* demonstraram pouco ou quase nenhum derivado do ácido cinâmico (cumarina, ácido o-cumárico e dihidrocumarina), sendo encontrado apenas diterpenos do tipo caureno (ácidos caurenóico, benzoilgrandiflorico e cinamoilgrandiflorico), derivados do ácido cafeico (ácido clorogênico e ácido dicafeoilquínico) e siringaldeído nestas amostras, FIGURA 3. Em contrapartida, as análises cromatográficas de amostras de *M. laevigata* demonstraram diterpenos do tipo caureno, siringaldeído e derivados do ácido cinâmico, em especial cumarina, em quantidades atendendo ao preconizado pela Farmacopeia Brasileira VI, entretanto não apresentaram derivados do ácido cafeico (ALMEIDA *et al.*, 2017; BERTOLUCCI *et al.*, 2013a; DE MELO; SAWAYA, 2015, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2013; UENO; SAWAYA, 2019; VIEIRA *et al.*, 2020).

FIGURA 3 – PRINCIPAIS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ENCONTRADOS NO GUACO



FONTE: O autor (2022)

Além da cumarina, para as demais moléculas oriundas do metabolismo secundário do guaco descritas anteriormente, existem trabalhos publicados correlacionando-as a propriedades anti-inflamatórias. Para os diterpenos do tipo caureno, em especial o ácido caurenóico, Cho e colaboradores (2010) descrevem o efeito inibitório em asma mediada por IgE em porquinho-da-índia. No estudo, é demonstrada a relação dose-dependente desses diterpenos com a inibição do recrutamento de eosinófilos e neutrófilos nos pulmões dos animais, bem como a inibição da liberação do mediador químico histamina, um dos principais responsáveis pela mediação da resposta alérgica e inflamatória na resposta asmática inicial. Também houve redução na atividade da fosfolipase A2, outro mediador da resposta inflamatória.

Já para os derivados do ácido cafeico, em especial o ácido clorogênico, já são bem estudadas e conhecidas suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Em trabalho recente foi demonstrado em modelo *in vitro* a redução dose-dependente induzida pelo ácido clorogênico em vários mediadores inflamatórios como óxido nítrico, esse bastante presente na mediação de processos asmáticos, e ciclooxigenase-2, além de atenuar citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa, interleucina-1 e interleucina-6. Além disso, a adesão de macrófagos induzida por endotoxinas também foi reduzida (HWANG *et al.*, 2014). Em outro estudo, Bisht e colaboradores (2020) demonstram o efeito sinérgico do ácido clorogênico com a curcumina, molécula com ação anti-inflamatória bem documentada. No estudo, os autores concluem que o ácido clorogênico potencializou a ação anti-inflamatória da curcumina, com a redução na produção do fator de necrose tumoral alfa, interleucina-6 e ciclooxigenase-2. Esse último trabalho pode muito bem representar o que ocorre no guaco. Outro efeito importante relatado pelo trabalho foi a proteção na viabilidade celular dada pelo ácido clorogênico quando comparada a administração da curcumina isolada.

Finalmente, estudos dos extratos das duas espécies de guaco também descrevem atividade anti-inflamatória em modelos animais. Freitas e colaboradores (2008) avaliaram o efeito dos extratos hidroalcoólicos de *M. glomerata* e *M. laevigata* na inflamação pulmonar e estresse oxidativo causado pela exposição aguda de ratos Wistar à poeira de carvão. As análises histopatológicas dos pulmões dos animais demonstram uma redução na infiltração por células inflamatórias nos tecidos dos animais tratados com os extratos em relação aos não tratados, com redução também

das contagens de células inflamatórias no lavado bronco-alveolar. Outro fator importante é que apenas os animais tratados com o extrato de *M. laevigata* apresentaram redução na atividade da enzima lactato desidrogenase, correlacionada com a morte celular. Desta forma, essa última espécie apresentou além de ação anti-inflamatória, um efeito protetor para as células dos pulmões frente ao estresse causado pela poeira do carvão.

Outro trabalho realizado avaliou a ação anti-inflamatória do extrato hidroalcolico composto por mistura de quatro espécies vegetais, dentre elas *M. glomerata* em um modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica induzida por fumaça de cigarro em ratos Wistar. Foi encontrado efeito sinérgico entre as quatro plantas com redução dos leucócitos na lavagem bronco-alveolar, número de macrófagos e mastócitos nos pulmões, além de prevenir congestão pulmonar e metaplasia da traqueia. A mistura também reduziu os níveis de mediadores inflamatórios (POSSEBON *et al.*, 2018).

Já o estudo mais recente de Della Pasqua e colaboradores (2019) apresentou uma comparação da atividade anti-inflamatória *in vivo* das duas espécies de guaco com o objetivo de avaliar a possibilidade de uso intercambiável de ambas. Nesse estudo foram utilizados três modelos de inflamação: a) indução de edema na pata de ratos por carragenana e composto 48/80; b) indução de pleurisia por carragenana; c) degranulação de mastócitos peritoneais pelo composto 48/80.

Os resultados do estudo mostram que os extratos das duas espécies foram capazes de reduzir o edema na pata dos ratos induzido por carragenana e composto 48/80, nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/kg, quando comparadas ao controle. Nenhum dos dois extratos foi capaz de prevenir a degranulação dos mastócitos peritoneais e conseqüentemente a liberação de histamina. Já no modelo de pleurisia, o extrato de *M. glomerata* não foi capaz de inibir a infiltração celular mesmo na maior concentração testada (400 mg/kg), já o extrato de *M. laevigata* foi capaz de reduzir a migração de leucócitos de forma dose dependente.

Os resultados demonstram não apenas uma diferença de atividade entre as espécies frente ao modelo de inflamação de pleurisia, mas também que outras moléculas devem contribuir para a ação anti-inflamatória observada no modelo de edema de pata dos ratos. Isso pode ser afirmado uma vez que o estudo também monitorou nos extratos administrados aos animais os metabólitos secundários descritos para a espécie, tendo encontrado quantidades desprezíveis dos derivados do ácido cinâmico

(cumarina, 7-hidroxicumarina e ácido o-cumárico) para *M. glomerata*. Logo, não é esperado que estas moléculas tenham contribuído para o resultado observado. Conseqüentemente, os resultados levaram os autores a concluir que não é possível a utilização das espécies de guaco de forma intercambiável.

3.1.2 Segurança do guaco

Alguns estudos pré-clínicos para avaliar diferentes aspectos de segurança do guaco foram conduzidos nos últimos anos, os modelos utilizados para essas avaliações variam bastante, com alguns estudos *in vitro* e outros *in vivo*. Com relação a estudos com humanos, apenas dois trabalhos foram publicados. No QUADRO 3 são reunidos os artigos que avaliaram este tema e apresentado o desfecho para cada um deles.

QUADRO 3 – ESTUDOS DE SEGURANÇA DO GUACO

(continua)

AUTOR	ESPÉCIE ESTUDADA	TIPO DO ESTUDO	MODELO ESTUDADO	DESFECHO
SÁ <i>et al.</i> , 2003	<i>M. glomerata</i>	<i>In vivo</i>	Toxicidade para o sistema reprodutor de ratos machos Wistar	Ausências na alteração no órgão reprodutor, redução da produção de esperma e níveis de testosterona
SÁ <i>et al.</i> , 2006	<i>M. glomerata</i>	<i>In vivo</i>	Mutagenicidade em ratos machos Wistar	Ausência de redução da fertilidade e mutagenicidade
GRAÇA <i>et al.</i> , 2007a	<i>M. laevigata</i>	<i>In vivo</i>	Toxicidade intraperitoneal e oral em ratos e camundongos	Ausência de toxicidade subcrônica e crônica em parâmetros hematológicos e bioquímicos
GRAÇA <i>et al.</i> , 2007b	<i>M. laevigata</i>	<i>In vivo</i>	Toxicidade para o sistema reprodutor de ratos machos Wistar	Ausência de toxicidade para o sistema reprodutor dos ratos
COSTA <i>et al.</i> , 2008	<i>M. glomerata</i>	<i>In vitro</i>	Dano ao DNA em hepatócitos de ratos – ensaio do cometa	Encontrado dano ao DNA em altas concentrações do extrato
BOUZADA <i>et al.</i> , 2009	<i>M. glomerata</i>	<i>In vitro</i>	Citotoxicidade para ovos de <i>Artemia salina</i>	Encontrado efeito citotóxico
DALLA NORA <i>et al.</i> , 2010	<i>M. glomerata</i>	<i>In vitro</i>	Efeito antiproliferativo e genotóxico para células de cebola	Encontrado efeito antiproliferativo e genotóxico para as células
SÁ; LEITE; ALMEIDA, 2010	<i>M. glomerata</i>	<i>In vivo</i>	Toxicidade para o sistema reprodutor de ratos machos Wistar	Ausência de efeitos tóxicos no sistema reprodutor dos animais

QUADRO 3 – ESTUDOS DE SEGURANÇA DO GUACO

(conclusão)

AUTOR	ESPÉCIE ESTUDADA	TIPO DO ESTUDO	MODELO ESTUDADO	DESFECHO
FULANETTI <i>et al.</i> , 2016	<i>M. glomerata</i>	<i>In vivo</i>	Toxicidade para formação dos fetos de ratos Wistar	Ausência de efeitos teratogênicos para os fetos
LEITE <i>et al.</i> , 2019	<i>M. laevigata</i>	<i>In vitro</i>	Efeito anticoagulante em sangue humano – tempo de protrombina, tempo de tromboplastina e concentração de fibrinogênio	Efeito anticoagulante observado
DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2019	<i>M. glomerata</i>	<i>In vitro</i>	Dano ao DNA em células do sangue humano – ensaio do cometa	Encontrado dano ao DNA em altas concentrações do extrato
SOARES <i>et al.</i> , 2006	<i>M. glomerata</i> *	Clínico	Segurança em indivíduos adultos saudáveis	Ausência de efeitos tóxicos em parâmetros clínicos e bioquímicos
TAVARES <i>et al.</i> , 2006	<i>M. glomerata</i> *	Clínico	Segurança em indivíduos adultos saudáveis	Ausência de efeitos tóxicos em parâmetros clínicos e bioquímicos

NOTA: *Avaliada na presença de outras espécies vegetais.

Os trabalhos publicados por Graça e colaboradores (2007b, 2007a), são os únicos a administrar o fitoterápico na forma de xarope aos animais. Nesses trabalhos, a quantidade de cumarina administrada através do xarope de guaco foi monitorada e reportada como sendo 3,5; 7,0 e 14,0 mg/kg/dia, considerando que a área superficial corporal do rato é sete vezes maior em relação aos humanos, a dose administrada equivaleria a uma dose oral de cumarina em humanos de 0,483 mg/kg/dia, ou aproximadamente 34 mg/dia, o que seria quase sete vezes maior que a dose máxima permitida pela ANVISA de 5 mg/dia de cumarina.

Os resultados apresentam valores de DL₅₀ bastante elevados para o medicamento administrado por via oral (DL₅₀ = 10 g/kg) tanto para ratos quanto para camundongos. Também não foram observadas variações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, bem como ausência de toxicidade hepática, renal ou pancreática, mesmo após 90 dias de tratamento oral dos ratos nas doses de 75, 150 e 300 mg/kg de xarope de guaco. Já o tratamento com doses de 3,5; 7,0 e 14,0 mg/kg de cumarina por via oral em ratos durante 90 dias não apresentou alterações no peso corporal e de alguns órgãos (testículos, epidídimo, próstata e vesícula seminal), bem como não foram observadas alterações no número de espermatozoides e espermátides ou na morfologia dos espermatozoides, o que indica ausência de toxicidade para o sistema reprodutor dos animais machos.

Os demais trabalhos *in vitro* e *in vivo* apresentados no QUADRO 4 utilizaram extratos das plantas em diferentes concentrações e solventes extratores para administração nos modelos escolhidos para o estudo.

Sá e colaboradores (2003, 2006; 2010) utilizaram extrato hidroalcolólico, com a administração de 3,3 g do extrato por quilograma dos ratos durante 52 e 90 dias de tratamento. Entretanto, esses estudos não reportam a concentração dos metabólitos secundários do guaco no extrato.

Costa e colaboradores (2008) utilizaram a infusão em água além do macerado hidroalcolólico no estudo. Apenas as quantidades de cumarina nos extratos foram reportadas no estudo, entretanto, a infusão aquosa, com menores concentrações de cumarina em relação ao macerado, apresentou efeito de genotoxicidade mais pronunciado, o que levou os pesquisadores a concluir que a concentração de cumarina não está relacionada ao efeito observado e que outras moléculas contribuíram para o efeito. Outra conclusão a que chegam os autores do estudo é que a relação dose-efeito observada pode não ter sido causada apenas pelas moléculas existentes nos extratos, uma vez que as células de hepatócitos de ratos empregadas no estudo são metabolizadoras, conseqüentemente, o efeito pode resultar do metabolismo celular dessas moléculas, metabolismo esse diferente em relação ao humano como se apresentará mais à frente.

Extrato metanólico na proporção de 50 g de folhas para 600 mL de metanol foi utilizado por Bouzada e colaboradores (2009), embora os autores não relatem a concentração das moléculas de interesse da espécie vegetal, são reportados efeitos de citotoxicidade no modelo estudado.

Dalla Nora e colaboradores (2010) empregaram infusões em água de folhas da planta nas concentrações de 4 e 16 g/L para avaliar a segurança do extrato, não são reportadas as concentrações dos metabólitos secundários para os extratos. É relatado que para as duas concentrações das infusões foram encontrados efeitos de inibição da divisão celular para as células de cebola, além de efeito genotóxico.

O trabalho de Fulanetti e colaboradores (2016) utilizou o extrato aquoso, sem relatar a concentração dos metabólitos secundários do guaco. Foram administrados para os ratos durante o primeiro, quinto, décimo e décimo quinto dia de gestação 0,2 ou 0,4 g do extrato de guaco por via oral e não foram observados efeitos teratogênicos.

Leite e colaboradores (2019) utilizaram extrato hidroalcolólico nas concentrações 1,67; 2,26 e 2,86 mg/mL em relação ao plasma humano para avaliação

do efeito anticoagulante. A relação extrato/plasma utilizada no estudo é equivalente ao consumo de uma única dose de 100 mL de xarope de guaco contendo 10% de extrato por uma pessoa de 70 kg, considerando um volume médio de 5,0 L de sangue e uma proporção de 55% de plasma no sangue. Os extratos foram analisados frente aos seus marcadores químicos, porém as concentrações das moléculas não foram reportadas

Finalmente, Dos Santos e colaboradores (2019) empregaram infuso aquoso de folhas de guaco para avaliar o efeito do dano ao DNA. A concentração de cumarina no estudo foi analisada e ajustada para que 0,5 mg da molécula, quantidade mínima diária permitida pela ANVISA, fosse avaliada. As células empregadas no estudo não são metabolizadoras, o que significa que o efeito observado se deve apenas aos componentes do extrato. Sendo que o dano ao DNA observado foi reparado pelos mecanismos celulares em 24 h de estudo.

Os artigos apresentados sugerem a segurança das espécies avaliadas frente aos modelos testados, com quatro efeitos tóxicos encontrados *in vitro*.

Entretanto, os efeitos encontrados nos modelos estudados devem ser avaliados com cautela e sua extrapolação para o organismo humano deve levar em consideração as diferenças existentes para a via de administração do medicamento e os efeitos de metabolismo em cada organismo vivo.

No trabalho publicado por Gasparetto e colaboradores em 2012, os autores discutem as diferenças entre o metabolismo da cumarina, principal marcador do guaco, nas espécies de ratos e camundongos em relação à humana. Considerando as diferenças apresentadas pelos autores, deve-se ter cautela ao extrapolar os resultados observados frente à avaliação da segurança em modelos animais para o organismo humano. Enquanto em ratos e camundongos a cumarina introduzida por via oral sofre biotransformação pela via da 3,4-epoxidação, o que leva a formação de compostos tóxicos, em humanos a via majoritária de metabolização é a 7-hidroxilação, com a formação de 7-hidroxi cumarina que é facilmente excretada pela urina, o que foi confirmado por estudos farmacocinéticos (GASPARETTO *et al.*, 2012). Assim, os metabólitos gerados pelos organismos animais e que promovem as ações tóxicas e/ou farmacológicas não são necessariamente os mesmos que os observados no organismo humano quando o guaco é administrado.

Além disso, uma vez absorvida após a ingestão por via oral em humanos, apenas 2 a 6% da cumarina ingerida atingem a circulação sistêmica na sua forma

intacta, sendo rapidamente transformada a 7-hidroxi cumarina, atingindo o pico da concentração plasmática 30 min após a ingestão (LEONART *et al.*, 2017). Logo, modelos *in vitro* para o estudo da segurança do guaco também não parecem os mais adequados para representar o comportamento no organismo humano, uma vez que o extrato ou solução de guaco adicionado ao meio celular alvo do teste contém moléculas que não sofrem biotransformação pelo organismo humano.

Finalmente, os únicos dois estudos clínicos disponíveis, conforme QUADRO 3, foram conduzidos com medicamentos fitoterápicos contendo associação de espécies. No estudo de Soares e colaboradores (2006) é avaliado um medicamento contendo guaco associado a outras 4 espécies – *Grindelia hirsutula* Hook. & Arn. (sin. *Grindelia robusta* Nutt.), *Copaifera officinalis* (Jacq.) L., *Myroxylon toluifera* (L.) Harms. e *Rorippa nasturtium-aquaticum* (L.) Hayek (sin. *Nasturtium officinale* W.T.Aiton). Já no estudo de Tavares e colaboradores (2006), o medicamento utilizado possui guaco associado a outras 3 espécies – *Mentha piperita* L., *Eucalyptus globulus* Labill. e *Copaifera multijuga* Hayne.

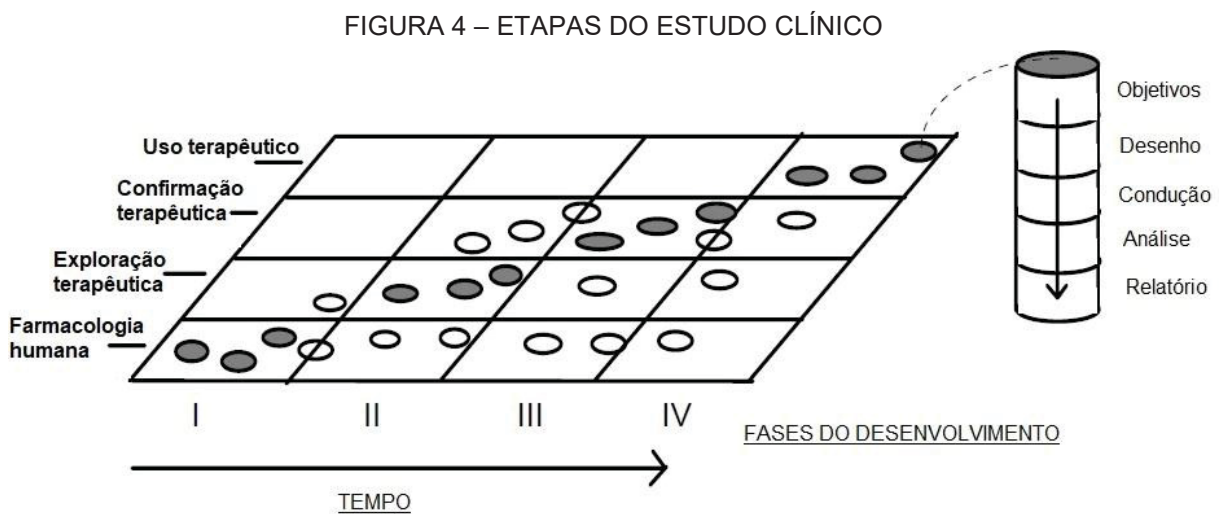
Com os estudos clínicos disponíveis não é possível concluir sobre a segurança especificamente do guaco. Além disso, em nenhum dos dois estudos é reportada a composição química dos medicamentos, não sendo possível avaliar se foi administrado aos voluntários a posologia de cumarina hoje preconizada pela ANVISA por dia. Dessa forma, persiste a necessidade de avaliação da segurança em humanos das duas espécies conhecidas como guaco.

3.2 ESTUDOS CLÍNICOS

Segundo a RDC Nº 9, de 20 de fevereiro de 2015, publicada pela ANVISA, ensaios clínicos são definidos como pesquisas conduzidas em seres humanos com o objetivo de descobrir ou confirmar os efeitos clínicos e/ou farmacológicos e/ou qualquer outro efeito farmacodinâmico do medicamento experimental e/ou identificar qualquer reação adversa ao medicamento experimental e/ou estudar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção do medicamento experimental para verificar sua segurança e/ou eficácia. (BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015). Consequentemente, esses estudos são necessários para que

novos medicamentos sejam registrados nas principais agências reguladoras de saúde pública do mundo.

Os estudos clínicos são tradicionalmente divididos nas fases I, II, III e IV. Embora seja importante essa divisão para dar uma estimativa do progresso dos ensaios conduzidos com um novo medicamento, é importante reconhecer que a fase de desenvolvimento fornece uma base inadequada para a classificação de ensaios clínicos, pois um tipo de ensaio pode ocorrer em várias fases. Atualmente, é preferível um sistema de classificação que utilize objetivos de estudo, pois cada uma dessas fases possui objetivos que podem se sobrepor, com o intuito de, ao término de todas as etapas, garantir a segurança e eficácia do medicamento (FIGURA 4). As características dos indivíduos envolvidos em cada uma das fases, bem como o seu número, são variadas como forma de aumentar a segurança estatística sobre as conclusões obtidas ao término do estudo (ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 1997).



FONTE: ICH E8 (1997)

NOTA: Círculos em cinza escuro representam os tipos de estudo usualmente conduzidos em cada fase da pesquisa clínica. Círculos em branco representam certos tipos de estudo que podem ser conduzidos naquela fase, porém são menos usuais. Cada círculo representa um estudo clínico individual, para ilustrar o desenvolvimento de um único estudo, o último círculo cinza foi estratificado em uma coluna que apresenta os elementos e a sequência a ser seguida no estudo.

Abaixo são apresentados os objetivos para cada fase da pesquisa clínica conforme descrito no guia E8 – Considerações Gerais para Ensaios Clínicos, publicado pela Conferência Internacional de Harmonização - ICH (1997).

Fase I – Tipo mais comum de estudo: Farmacologia humana.

Consiste na avaliação da administração inicial de uma nova droga de investigação em humanos.

Embora os estudos farmacológicos humanos sejam tipicamente identificados com a Fase I, eles também podem ser avaliados em outros pontos da sequência de desenvolvimento. Os estudos nesta fase de desenvolvimento geralmente têm objetivos não terapêuticos e podem ser realizados em voluntários saudáveis ou em certos tipos de pacientes, por exemplo, pacientes com hipertensão leve. Os estudos nesta fase podem ser abertos, controlados por linha de base ou podem usar randomização e cegamento, para melhorar a validade das observações. Os estudos realizados na Fase I normalmente podem envolver a combinação dos seguintes aspectos: estimativa da segurança inicial e tolerabilidade, farmacocinética, avaliação da farmacodinâmica, medida inicial da atividade da droga.

Considerando especificamente a avaliação da segurança dos medicamentos, o mesmo guia E8 do ICH descreve que antes que estudos clínicos sejam iniciados, estudos não clínicos sejam conduzidos como forma de assegurar a segurança da terapia pretendida e orientar as doses a serem testadas do medicamento nos estudos iniciais de toxicidade em humanos - Fase I.

Para a avaliação da segurança e tolerabilidade do medicamento, nessa fase da pesquisa geralmente são monitorados marcadores no sangue dos indivíduos que sinalizam alguma toxicidade para fígado e rins, principais órgãos envolvidos na eliminação dos fármacos, bem como para o sistema hematopoiético. Também são monitorados sinais clínicos que evidenciem alterações em alguns dos principais sistemas do corpo humano: neurológico, pele, musculoesquelético, gastrointestinal, endócrino e cardiovascular. (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; IKEDA *et al.*, 2019).

Além disso, devem ser monitorados pelo pesquisador a ocorrência de evento adverso (EA), definido pela RDC 9 de 20 de fevereiro de 2015 como qualquer ocorrência médica adversa em um paciente ou participante do ensaio clínico a quem um produto farmacêutico foi administrado e que não necessariamente tenha uma relação causal ao tratamento. Como resultado, um EA pode ser qualquer sinal, sintoma, ou doença desfavorável e não intencional (incluindo resultados fora da faixa de referência), associada com o uso de um produto sob investigação, quer seja relacionada a ele ou não. Esses eventos adversos podem ser monitorados através de

dos sinais clínicos e exames mencionados no parágrafo anterior, mas também pela aplicação de questionários clínicos preenchidos pelos voluntários da pesquisa.

Fase II – Tipo mais comum de estudo: Exploração terapêutica.

A Fase II é geralmente considerada como o início dos estudos nos quais o objetivo principal é explorar a eficácia terapêutica em pacientes.

Esses estudos exploratórios iniciais podem utilizar uma variedade de desenhos experimentais, incluindo controles simultâneos e comparações com o status inicial. Os estudos subsequentes são geralmente randomizados e simultaneamente controlados para avaliar a eficácia do medicamento e sua segurança para uma indicação terapêutica específica. Os estudos na Fase II são normalmente conduzidos em um grupo de pacientes que são selecionados por critérios relativamente estreitos, levando a uma população relativamente homogênea.

Um objetivo importante para esta fase é determinar a(s) dose(s) e o regime posológico para orientar os ensaios da Fase III. Estudos iniciais nesta fase frequentemente utilizam desenhos de escalonamento de dose, para dar uma estimativa antecipada da dose-resposta e estudos posteriores podem confirmar essa relação de dose-resposta para a indicação em questão, através da aplicação de desenhos de dose-resposta paralelos. Estudos confirmatórios de dose-resposta podem ser realizados na Fase II ou deixados para a Fase III. As doses utilizadas na Fase II são geralmente, mas nem sempre inferiores às doses mais altas utilizadas na Fase I.

Os objetivos adicionais dos ensaios clínicos realizados na Fase II podem incluir a avaliação de potenciais desfechos do estudo, regimes terapêuticos (incluindo medicamentos concomitantes) e populações-alvo (por exemplo, doença leve versus doença grave) para estudos adicionais nas Fases II ou III. Estes objetivos podem ser atendidos por análises exploratórias, examinando subconjuntos de dados e pela inclusão de múltiplos desfechos nos ensaios.

Fase III – Tipo mais comum de estudo: Confirmação terapêutica.

Geralmente considera-se que a Fase III começa com o início dos estudos nos quais o objetivo principal é demonstrar ou confirmar o benefício terapêutico.

Os estudos na Fase III destinam-se a confirmar as evidências preliminares acumuladas na Fase II de que um medicamento é seguro e eficaz para uso na

indicação pretendida e na população receptora. Estes estudos destinam-se a fornecer uma base adequada para a aprovação de comercialização. Os estudos na Fase III também podem explorar melhor a relação dose-resposta, ou explorar o uso do medicamento em populações mais amplas, em diferentes estágios da doença, ou em combinação com outro medicamento. Para medicamentos destinados a serem administrados por longos períodos, os ensaios que envolvem exposição prolongada ao medicamento são normalmente conduzidos na Fase III, embora possam ser iniciados na Fase II. Estes estudos realizados na Fase III completam as informações necessárias para apoiar instruções adequadas para o uso do medicamento, gerando as informações oficiais do produto que orientarão profissionais de saúde e constarão na bula do medicamento.

Fase IV – Variedade de estudos: Uso terapêutico.

A fase IV começa após a aprovação do medicamento. Os estudos de uso terapêutico vão além da demonstração prévia da segurança, eficácia e definição da dose do medicamento.

Os estudos na Fase IV são todos os estudos (exceto a vigilância de rotina) realizados após a aprovação do medicamento e relacionados com a indicação aprovada. São estudos que não foram considerados necessários para aprovação, mas que muitas vezes são importantes para otimizar o uso do medicamento. Eles podem ser de qualquer tipo, mas devem ter objetivos científicos válidos. Os estudos comumente conduzidos incluem interação adicional droga-droga, estudos de dose-resposta ou segurança e estudos projetados para apoiar o uso sob a indicação aprovada, por exemplo, estudos de mortalidade/morbidade, estudos epidemiológicos.

Para cada estudo conduzido em qualquer das fases apresentadas da pesquisa clínica, alguns princípios devem ser atendidos para o planejamento das cinco etapas essenciais: objetivos, desenho do estudo, condução do estudo, análise dos dados, relato do estudo. Cada etapa deve ser definida em um protocolo antes do início do estudo considerando as premissas abaixo.

a) Objetivos

Os objetivos devem ser claramente definidos e podem incluir a avaliação ou confirmação de características como segurança e/ou eficácia ou outras características como apresentado nos parágrafos anteriores.

b) Desenho do estudo

A etapa mais longa a ser detalhada, e que envolve uma série de definições importantes para o sucesso da pesquisa.

Nesta etapa devem ser definidos: o modelo do estudo (grupos paralelos, crossover, escalonamento de doses, doses fixas), comparadores utilizados, desfechos avaliados, métodos de monitoramento dos EA, formato de recrutamento dos voluntários, critérios de inclusão e exclusão dos voluntários, número de voluntários a serem recrutados, definição dos grupos controles, variáveis a serem monitoradas durante o estudo, métodos para minimização de viés (cegamento, randomização, entre outros).

c) Condução do estudo

O estudo deve ser conduzido considerando os princípios de ética definidos nos guias e legislações publicados, além ficar restrito ao protocolo clínico definido. Caso alterações venham a ser realizadas no protocolo, nova avaliação de ética deve ser solicitada.

d) Análises dos dados

O plano de análise deve ser apropriado para o objetivo e desenho do estudo, levando em consideração o método de alocação dos voluntários no estudo, medições realizadas e hipóteses a serem testadas. Uma descrição dos métodos estatísticos empregados deve ser incluída.

e) Relato do estudo

Os relatórios do estudo devem ser adequadamente documentados e atender as legislações e guias locais.

Atualmente, para que estudos clínicos sejam conduzidos no Brasil é necessário que o protocolo clínico passe por avaliação de um comitê de ética e obtenha sua aprovação prévia. Para isso, os estudos clínicos são centralizados nos comitês de ética em pesquisa (CEP), devendo ser registrados nesses comitês em nível institucional para cada centro de estudo. O CEP é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade

e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) é o órgão central responsável pela coordenação da rede de CEP institucionais e, conseqüentemente, pelo registro e credenciamento desses centros. A CONEP é um órgão consultivo colegiado diretamente ligado ao Conselho Nacional de Saúde (CNS), um órgão permanente dentro do SUS (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Tanto os CEP quanto a CONEP são responsáveis por avaliar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos e por aprovar os protocolos de pesquisa quando aplicável, independentemente da fase do estudo conforme apresentado mais à frente. A Resolução 446 de 11 de agosto de 2011 observa ainda que as instituições que realizam pesquisas envolvendo participantes humanos podem estabelecer um ou mais CEP de acordo com suas exigências particulares. Para aquelas instituições sem um CEP, ou no caso de um pesquisador sem afiliação institucional, a CONEP é obrigada a sugerir um CEP para conduzir a revisão do protocolo. Juntos, os CEP e a CONEP representam o sistema de revisão ética no Brasil, conhecido como sistema CEP/CONEP.

Todo o processo de submissão dos protocolos clínicos ao sistema CEP/CONEP, bem como a emissão dos pareceres de avaliação ética para com anuência ou recusa do desenvolvimento da pesquisa ocorrem através do Plataforma Brasil, um sistema que opera via internet. A Plataforma Brasil foi criada para fornecer um registro nacional e unificado para pesquisas envolvendo participantes humanos. A plataforma é também uma ferramenta de gestão para o Sistema CEP/CONEP. As aplicações de pesquisa podem ser rastreadas desde a submissão até a aprovação final pelo CEP, e quando necessário, pela CONEP. As aplicações com coordenação ou patrocínio com origem fora do Brasil requerem uma revisão ética adicional pela CONEP, a menos que o copatrocinador seja o governo brasileiro (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

3.2.1 Estudos clínicos e fitoterápicos

No Brasil, os fitoterápicos são considerados medicamentos e, conforme essa categoria, estão sujeitos ao regime de vigilância sanitária exercido pela ANVISA. O

registro desses medicamentos atualmente é regulamentado pela RDC 26 de 13 de maio de 2014 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Nesse documento, fitoterápico é definido como um produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014b).

Como consequência, apenas produtos que sejam submetidos para avaliação pela ANVISA e atendam aos requisitos de segurança e eficácia definidos pela agência reguladora podem ser comercializados em solo nacional.

Desta forma, a legislação brasileira atual prevê que a segurança e eficácia dos medicamentos fitoterápicos possa ser demonstrada através de duas formas:

1) Estudos não clínicos e clínicos – nesta situação deverão ser conduzidos estudos que atendam a legislação nacional vigente sobre o tema, além de ser utilizada a droga vegetal ou derivado vegetal da espécie correta, indicação terapêutica e posologia que se pretende registrar;

2) Registro simplificado – poderá ser demonstrado através da presença da espécie de interesse na lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado, atualmente a Instrução Normativa-IN nº 2, de 13 de maio de 2014 ou a presença nas monografias de fitoterápicos de uso bem estabelecido da Comunidade Europeia (Community herbal monographs with well-established use) elaboradas pelo Comitê de Produtos Medicinais Fitoterápicos (Committee on Herbal Medicinal Products - HMPC) da European Medicines Agency (EMA). Nesse caso, devem ser seguidas integralmente as especificações definidas na referência utilizada.

Para os produtos tradicionais fitoterápicos, como o caso do guaco, o registro é concedido após a comprovação da segurança e eficácia por uma das duas formas:

1) Comprovação de uso seguro e efetivo para um período mínimo de 30 anos – sendo que o tempo de uso tradicional deverá ser comprovado para o insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV) na formulação, podendo haver alterações de excipientes, desde que se comprove que essas alterações não promoveram mudanças significativas no perfil cromatográfico do produto. Além disso, o uso

tradicional deverá ser comprovado por meio de documentações técnico-científicas, conforme referências publicadas pela própria Anvisa.

2) Registro simplificado – comprovado através dos mesmos critérios descritos anteriormente para medicamentos fitoterápicos. Para cumprir com esse último critério, o produto tradicional deve ser formulado atendendo ao descrito em compêndios oficiais publicados no Brasil ou exterior

O que se percebe, pelas alternativas de registro apresentadas na legislação, é que os detentores de registro procuram na sua grande maioria registrar medicamentos fitoterápicos ou produtos tradicionais fitoterápicos que não necessitem da realização de estudos clínicos. Esse fato pode ser explicado por razões econômicas e de tempo, uma vez que a condução destes estudos ainda exige um alto investimento financeiro, além de exigir alguns meses ou anos para sua realização.

Conseqüentemente, para a grande maioria dos fitoterápicos registrados no Brasil, os dados clínicos disponíveis de segurança e eficácia são poucos e, em quando disponíveis, são para espécies vegetais não nativas da flora nacional. Já para espécies botânicas da flora nacional, os dados clínicos são escassos, o que pode ser demonstrado através de uma busca por trabalhos científicos publicados nas principais bases de dados destinadas à divulgação científica, quando essa busca é realizada, o retorno de trabalhos para os termos “clinical”, “trial”, “brazilian” e “plant” em diferentes combinações de busca é bastante limitado.

Assim, de acordo com trabalhos recentes, do ponto de vista global existe uma ausência de evidência científica para avaliar a segurança e eficácia de plantas medicinais, uma vez que os estudos publicados são poucos e mesmo os que existem são conduzidos na sua maioria com um número menor do que 100 voluntários, o que conduz a uma dificuldade na extrapolação das conclusões para a população em geral (PARVEEN *et al.*, 2015; SUN; QIAN, 2021).

Corroborando com a necessidade de fomentar estudos clínicos com fitoterápicos, a OMS publicou um guia para condução de estudos clínicos com estes medicamentos, esse guia foi traduzido e publicado no Brasil pelo Ministério da Saúde com o título - Instruções operacionais: Informações necessárias para a condução de ensaios clínicos com fitoterápicos. Nesse documento existem orientações para que os estudos clínicos sejam conduzidos com fitoterápicos como forma a embasar o uso tradicional associado a eles, mas para isso é necessário que os estudos respeitem a

forma de uso tradicional da planta em estudo. (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Primeiramente, em consonância ao guia E8 do ICH, o guia da OMS descreve a importância de dados pré-clínicos serem avaliados previamente ao início dos estudos clínicos. Desta forma, um extenso levantamento bibliográfico deve ser realizado com o objetivo de confirmar na literatura científica a existência de informações sobre toxicologia da espécie vegetal, bem como a eficácia em modelos *in vitro* e *in vivo*.

Após esta avaliação dos dados pré-clínicos, um protocolo clínico pode ser montado atendendo aos requisitos estabelecidos nos demais guias para estudo clínico. Entretanto, considerando as características próprias de um fitoterápico como sendo um medicamento obtido a partir de uma planta medicinal, especial atenção deve ser dada, antes do início das fases I e II da pesquisa, para alguns pontos referente à seleção, padronização e controle de qualidade do material vegetal e, conseqüentemente, à formulação do medicamento fitoterápico que será utilizado na pesquisa (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

- I) Identidade do material vegetal – correta identificação da espécie deve ser realizada considerando que existem muitos casos de falsificações / adulterações e dificuldade de identificação das plantas medicinais;
- II) Qualidade do cultivo e processamento do material vegetal – uso de boas práticas agrícolas no cultivo para garantir a qualidade do material vegetal e uso da parte correta da planta livre de contaminantes;
- III) Produção do medicamento fitoterápico – atendimento à boas práticas de fabricação (BPF) na sua formulação como forma de garantir a qualidade do medicamento;
- IV) Caracterização físico-química e microbiológica – caracterização físico-química quanto aos parâmetros de qualidade e marcadores químicos da espécie vegetal para se conhecer qual a dosagem está sendo administrada na pesquisa, além das análises microbiológicas para garantir que o medicamento é seguro para uso.

Finalmente, segundo o guia da OMS todas as fases descritas tradicionalmente para os estudos clínicos são aplicáveis e importantes para os medicamentos fitoterápicos. Até mesmo os estudos de fase I são importantes, uma vez que a sua

ampla utilização pela população sugere, mas não assegura, que os medicamentos tradicionais apresentam uma relação risco-benefício favorável. Desta forma, persiste a necessidade de avaliar os reais benefícios e os possíveis riscos apresentados pelos fitoterápicos, através da realização de ensaios clínicos conduzidos em conformidade com os princípios da ciência clínica atualmente praticada.

3.3 QUIMIOMETRIA E IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS

A química analítica moderna tem feito uso de instrumentos que fazem a aquisição de um número elevado de variáveis em uma única amostra. Como exemplo podem ser citadas a espectrometria no infravermelho (IV) e a espectrofotometria na região do UV/Vis. Tomando como exemplo a espectrometria no IV, nessa técnica é possível a aquisição de dados de absorção ou transmissão da amostra em uma região ampla do espectro eletromagnético, 10.000 a 4.000 cm^{-1} no infravermelho próximo e 4.000 a 400 cm^{-1} no infravermelho médio, isso significa que uma única varredura da amostra poderá apresentar mais de 3.000 dados gerados pelo equipamento.

Todavia, esses dados gerados pelo instrumento não produzem diretamente informações com um significado químico/farmacêutico para a aplicação imediata, por exemplo, na avaliação da semelhança entre amostras, mas sim, uma enorme profusão de sinais, números ou curvas. Para que esses dados tenham alguma utilidade para o conhecimento químico, é necessário que eles sejam transformados e interpretados adequadamente, o que não é uma tarefa simples. Considerando então esse volume de dados, houve a necessidade de novas ferramentas matemáticas e estatísticas capazes de tratar/converter grandes conjuntos de dados e extrair o máximo das suas informações úteis, isso deu origem à Quimiometria (FERREIRA *et al.*, 1999).

Existem várias definições para este campo interdisciplinar da ciência que envolve o emprego de métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e assim fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos, abaixo são citadas algumas: (FERREIRA, 2015).

- “A quimiometria é a aplicação de ferramentas matemáticas e estatísticas à química” (KOWALSKI, 1975);

- “Quimiometria é a aplicação de estatística à análise de dados químicos (de química orgânica, analítica ou de química medicinal) e o planejamento de experimentos químicos e simulações” (IUPAC);

- “Quimiometria é o uso de métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento, a interpretação e previsão de dados químicos” (MALINOWSKI, 1991).

Dentro da quimiometria, existe o campo de estudo de métodos multivariados de classificação, esse campo possui como objetivo encontrar modelos matemáticos capazes de reconhecer membros de um conjunto de dados e alocar esses membros em uma classe apropriada a partir dos dados analíticos gerados (BALLABIO; CONSONNI, 2013).

Desta forma, várias publicações tem surgido demonstrando o emprego eficiente de métodos multivariados de classificação para o tratamento de dados de técnicas cromatográficas e espectroscópicas para a classificação e diferenciação de espécies vegetais, além da orientação do local de cultivo e tempo de colheita (GAD *et al.*, 2013; JIN *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2014).

A abordagem quimiométrica apresenta algumas vantagens em relação às técnicas tradicionais de identificação de amostras vegetais – análise macroscópica, análise microscópica, CCD, CLAE, entre outras:

- Rápido tratamento dos dados e conclusão sobre o resultado;
- Não necessita de especialistas para avaliar o material vegetal;
- Não necessita de solventes químicos;
- Baixo custo.

Antes de iniciar a análise quimiométrica é necessário organizar e posteriormente tratar o conjunto de dados a serem avaliados. Primeiramente, a organização dos dados compreende montar uma matriz X ($n \times m$), cada amostra é associada a um respectivo vetor linha (n) da matriz, já cada coluna (m) da matriz se refere a uma variável medida, como por exemplo os números de onda de um espectro no infravermelho. Na interseção de cada linha e coluna são inseridos os resultados analíticos da amostra para aquela variável.

Após os dados devidamente organizados é possível realizar o pré-tratamento dos dados. O objetivo do pré-tratamento é reduzir as variações indesejáveis que não foram removidas durante a aquisição dos dados e que não serão eliminadas

naturalmente durante a análise, mas que podem influenciar os resultados. Entretanto, qualquer tipo de tratamento deve ser feito com cuidado e criteriosamente, para não distorcer, comprometer ou até mesmo inutilizar os resultados da análise.

Conceitualmente, o pré-tratamento dos dados pode ser dividido em duas categorias, transformação e pré-processamento. A transformação dos dados é aplicada às amostras, ou seja, ocorre nas linhas da matriz. Já o pré-processamento é aplicado às variáveis medidas, ocorre portanto nas colunas da matriz. Os diferentes pré-tratamentos podem ser utilizados individualmente ou combinados entre si para se atingir o objetivo desejado, para isso, é necessário que seja conhecido como o pré-tratamento funciona e qual o resultado da sua aplicação (FERREIRA, 2015).

Alguns exemplos de transformação dos dados são:

- 1) Alisamento (do inglês smoothing) – reduz a componente aleatória das medidas da amostra, ruído experimental, e conseqüentemente o aumento da razão S/R. Deve ser aplicado com cautela para evitar um superalisamento com conseqüente distorção ou eliminação de características importantes do espectro. Possui grande aplicação nas áreas de espectroscopia e cromatografia. As abordagens matemáticas mais comuns para o alisamento dos dados são o Alisamento pelo método da média, Alisamento pelo método da média móvel, Alisamento pelo método de Savitzky-Golay e Alisamento com filtros de Fourier;
- 2) Correção da linha de base – procura corrigir um problema instrumental comum que é o deslocamento do espectro como um todo de um valor constante positivo ou negativo em relação ao zero, bem como a inclinação da linha de base à medida que decresce o número de onda, por exemplo em uma análise por infravermelho. É uma técnica bastante comum para ser empregada no tratamento de dados de análises por IV com refletância difusa. Os modelos matemáticos empregados são a primeira derivada (corrige deslocamento dos dados) e segunda derivada (corrige deslocamento e inclinação dos dados). A desvantagem na aplicação das derivadas é o decréscimo da razão S/R;
- 3) Logaritmo – o objetivo é linearizar e reduzir assimetria das distribuições dos dados analíticos;
- 4) Normalização – nesse caso o objetivo da transformação é igualar a magnitude de cada amostra. Os valores de cada uma das variáveis de uma

amostra são divididos por um fator de normalização, por exemplo a norma dessa amostra;

- 5) Correção multiplicativa de espalhamento (MSC) – tem como objetivo reduzir efeitos de espalhamento aditivos e multiplicativos na absorbância. Esses efeitos são causados por fenômenos físicos, como mudanças no caminho ótico, na sensibilidade do detector, variações na temperatura e na pressão, diferenças no tamanho e na forma de partículas sólidas, entre outras, sendo, portanto, bastante aplicada em análises de infravermelho com refletância difusa, quando não há o preparo da amostra para a análise. Os efeitos do espalhamento são removidos deslocando e escalando cada espectro para que ele se ajuste ao espectro ideal;
- 6) Padronização normal de sinal (SNV) – assim como a MSC, a transformação SNV corrige efeitos aditivos e multiplicativos, sendo apropriada para remover interferências de espalhamento e de tamanho de partícula sólida. Corresponde a autoescalar cada linha da matriz original dos dados.

Já os pré-processamentos de dados mais comuns são resumidos abaixo (FERREIRA, 2015).

- 1) Centragem dos dados na média – nesse pré-processamento é calculado o valor médio de cada coluna da matriz, sendo essa média subtraída de cada um dos valores da respectiva coluna. É o mais frequentemente utilizado quando se trabalha com dados espectrais;
- 2) Escalamento pela variância – tem como fundamento a divisão dos dados de uma mesma coluna por um fator de escala que é uma medida da dispersão dos dados daquela coluna;
- 3) Autoescalamento – dados da coluna são centrados na média e posteriormente escalados pelo desvio padrão da coluna. É recomendado quando as variáveis possuírem diferentes unidades ou quando a faixa de variação dos dados é grande, pois o autoescalamento iguala o impacto de cada uma delas;
- 4) Escalamento pela amplitude – nesse pré-processamento o fator de escala é a amplitude dos dados da coluna;

- 5) Ponderação dos mínimos quadrados generalizados (GLSW) – em alguns casos, um tipo diferente de informação, relacionada a compostos interferentes, precisa ser atenuada, conseqüentemente, técnicas de pré-processamento avançado são necessárias.

Esse é o caso do GLSW, que consiste em um algoritmo com o objetivo de para estimar uma matriz de filtragem para reduzir o peso da desordem ocasionada por exemplo pela informação dos interferentes (SILVA *et al.*, 2018). Isso remove os interferentes de um espectro no infravermelho, por exemplo, mantendo a seletividade dos dados. O método consiste na compressão espacial dos dados multidimensionais do espectro nas dimensões de fora do eixo correspondente a região desses interferentes, quando esses dados são então analisados por técnicas multivariadas de classificação, o modelo se torna mais simples por não conter as variações dos interferentes indesejados (MARTENS *et al.*, 2003).

No caso de um problema de classificação, amostras similares seriam os membros de uma determinada classe. Qualquer variação dentro de cada grupo de classe (conhecida como "variação dentro da classe") pode ser considerada uma desordem que tornará a tarefa de classificação mais difícil. O objetivo da GLSW neste caso é remover esta variação dentro da classe tanto quanto possível, sem aproximar as classes (SERRANTI *et al.*, 2013).

O algoritmo padrão para GLSW usa um único parâmetro ajustável, alfa, que define a força das interferências de pesos para baixo. O ajuste de α para valores maiores, normalmente acima de 0,001, diminui o efeito do filtro, já os menores α , tipicamente abaixo de 0,001, aplicam mais filtragem (WISE *et al.*, 2006). Essa avaliação é importante porque em algum ponto o efeito do filtro é tão forte que começa a remover parte da informação relevante do dado, levando a padrões de ruído espectral e modelos pobres.

Com a seleção do pré-processamento dos dados é possível seguir com a aplicação da quimiometria para identificar as semelhanças e as diferenças em variados tipos de amostras, com o objetivo de realizar seu agrupamento e classificação, como por exemplo no caso de identificação de plantas medicinais.

Os métodos quimiométricos utilizados com essa finalidade são divididos em dois grupos, métodos não supervisionados e métodos supervisionados de reconhecimento de padrões.

As suposições que norteiam esses métodos são:

- 1) As amostras do mesmo tipo são semelhantes;
- 2) Existem diferenças significativas entre tipos diferentes de amostras;
- 3) O conjunto de medidas disponíveis é capaz de detectar essas semelhanças e diferenças.

Os métodos supervisionados utilizam classes pré-estabelecidas para classificar cada amostra analisada, essa informação é utilizada durante a análise dos dados e construção do modelo de classificação. Seu objetivo é construir uma regra preditiva para classificação dessas amostras. Dentro dessa categoria estão os métodos de Modelagem Independente e Suave por Analogia de Classe (SIMCA), Regra do Vizinho mais Próximo (k-NN) e Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA), dentre outros.

Já os métodos não supervisionados não fazem uso dessa informação de classes, logo, não requerem nenhum conhecimento prévia ao respeito da classificação das amostras. Não tem como objetivo construir uma regra preditiva, portanto são métodos de análise exploratória dos dados. Dentro desse grupo estão a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamento por Métodos Hierárquicos (HCA)

3.3.1 Análise de Componentes Principais – PCA

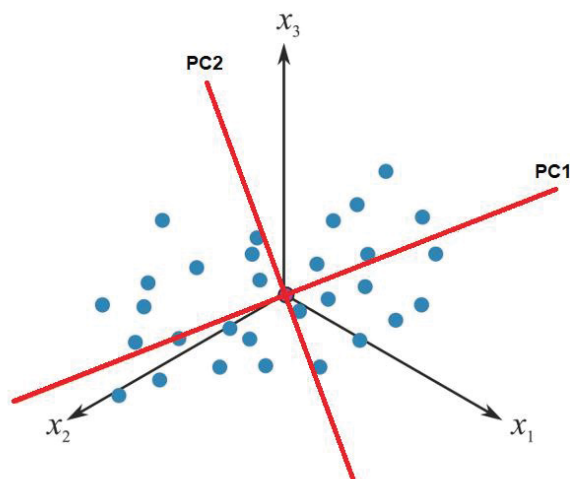
Previamente a calibração de modelos de classificação é sempre recomendado avaliar a estrutura dos dados e realizar uma análise exploratória com os seguintes objetivos: 1) detectar a presença de *outliers*; 2) reconhecer padrões na distribuição das amostras; 3) avaliar relações entre as variáveis e os pesos de cada uma no modelo. Sendo o método mais comum para análise exploratória dos dados a Análise de Componentes Principais (PCA) (BALLABIO; CONSONNI, 2013; WALCZAK; MASSART, 1998).

Esse é um método de compressão dos dados, que consiste na projeção dos dados multivariados em um espaço de dimensão menor, sem afetar as relações entre as amostras. A compressão dos dados é alcançada com combinações lineares das variáveis originais, para que sejam agrupadas aquelas que possuem informações semelhantes, eliminando a redundância dos dados. Isso dá origem a novas variáveis denominadas componentes principais (PC). Essas PCs são não correlacionadas e ortogonais entre si, ou seja, a informação de uma não está contida na outra. Além disso, pela remoção da redundância, quase toda a informação contida nos dados originais é descrita com poucas componentes principais.

A primeira PC, PC1, é definida pela direção que descreve a máxima variância dos dados originais. Já a PC2, e subsequentes, tem a direção de máxima variância dos dados no subespaço ortogonal à PC anterior, de forma a que descrevam uma a uma a máxima variância restante (FIGURA 5). Isso significa que as últimas PC contêm principalmente variações aleatórias, como erros experimentais e podem ser ignoradas.

As novas coordenadas das amostras, no novo sistema de eixos das componentes principais mostradas pela linha vermelha são denominadas de escores (*scores*). Já os coeficientes da combinação linear, ou o peso de quanto cada variável antiga contribui para a formação da PC, são denominados de pesos (*loadings*). Os escores expressam as relações entre as amostras, enquanto os pesos indicam as relações entre as variáveis (FERREIRA, 2015).

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE UM CONJUNTO DE DADOS TRIDIMENSIONAIS (x_1 , x_2 , x_3) E SUAS COMPONENTES PRINCIPAIS (PC1, PC2),



FONTE: O autor (2022)

Logo, inicialmente um modelo PCA deve ser empregado para avaliar os três itens citados no primeiro parágrafo. O modelo fornecerá uma ideia do agrupamento das amostras, bem como se existe algum *outlier*. Para a avaliação dos *outliers* as medidas mais utilizadas são a influência ou alavancagem da amostra (*leverage*) e o resíduo de Student. Um gráfico correlacionando esses dois fatores permite avaliar amostras anômalas, que se desgarram do grupo, quando esses dois fatores se apresentam elevados para a mesma amostra, existe uma forte evidência de que ela se trata de um *outlier*, podendo então ser removida nessa etapa.

3.3.2 Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais – PLS-DA

Métodos de classificação multivariada são técnicas com o objetivo de encontrar um modelo matemático capaz de reconhecer uma amostra como sendo membro de uma classe apropriada. Uma vez que o modelo de classificação tenha sido calibrado, pode ser realizada a predição de uma amostra desconhecida como membro de uma classe definida.

Para atingir a este propósito, as técnicas de classificação trabalham com variáveis qualitativas, como por exemplo uma classe de amostra, e define relações matemáticas entre essas variáveis e um grupo de variáveis descritivas, como a absorção de uma molécula na região do infravermelho. Dessa forma, o modelo opera uma decomposição bilinear dos espaços X (variáveis) e Y (classes), sob o pressuposto de que existe uma relação interna entre os dois espaços.

A análise discriminante dos quadrados mínimos parciais (PLS-DA) é um método de classificação linear que combina as propriedades de uma regressão dos quadrados mínimos parciais com o poder de discriminação de uma técnica de classificação. Dessa forma, o método opera uma decomposição bilinear dos blocos X (variáveis – por exemplo dados espectrais) e Y (classes), sob o pressuposto de que existe uma relação interna entre os dois espaços. Essa decomposição dará origem às variáveis latentes (VL), que são combinações lineares das variáveis originais, análogo ao que ocorre na PCA. O algoritmo aplicado procura formar VLs com covariância máxima em relação às variáveis em Y (BALLABIO; CONSONNI, 2013; SERRANTI *et al.*, 2013).

Após a formação das VLs, é necessário selecionar o número delas para construir o modelo PLS-DA, assim como foi escolhido o número PCs para o modelo PCA. Quando o número de VL é baixo e não representa adequadamente as variações dos dados originais, ocorre a falta de ajuste do modelo, quando então informações úteis ficam de fora. Entretanto, pode ocorrer sobre ajuste do modelo quando é escolhido um número excessivo de VLs, com a inclusão de ruídos espectrais ao modelo.

Para selecionar o número ideal de VLs nos modelos PLS-DA, as amostras são geralmente divididas em grupos de validação cruzada, usando por exemplo venezianas (*venetian blinds*) ou blocos contínuos (*continuous blocks*).

Nessas duas abordagens de validação, cada grupo de validação cruzada é removido do conjunto de calibração, um de cada vez. Cada vez, o modelo é calibrado nas amostras de treinamento restantes e depois usado para prever amostras do grupo de validação cruzada.

Para definir o tamanho dos grupos de validação cruzada é prática comum comparar diferentes estimativas da capacidade preditiva do modelo, que são obtidas usando um número decrescente de grupos de validação cruzada, o que significa condições de validação mais fortes. Quanto menor o valor da raiz da média quadrática dos resíduos de validação (RMSECV) melhor o ajuste do modelo.

O conjunto de calibração ou treinamento é o conjunto que contém informações a priori conhecidas para construir o modelo de calibração. O modelo é então testado usando um conjunto de amostras independentes com informações a priori conhecidas para validar as propriedades preditivas do modelo antes de usá-lo em amostras desconhecidas. Esta característica explica por que os métodos baseados em PLS geralmente têm melhor desempenho do que o PCA em problemas de previsão. (GAD *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2015).

Portanto, as amostras de cada classe devem ser separadas em dois conjuntos, conjunto de calibração e conjunto de predição. Para compor o conjunto de predição uma boa abordagem é a remoção de ao menos 30% das leituras das amostras de forma aleatória de cada uma das classes. Assim, primeiramente é montado o modelo de calibração com 70% dos dados empregando o mesmo pré-tratamento definido para o modelo PCA.

A capacidade preditiva do modelo para o conjunto de calibração é comparada por meio de sensibilidade e seletividade para cada tamanho de grupo. A sensibilidade

descreve a capacidade do modelo de reconhecer corretamente as amostras pertencentes a essa classe enquanto a seletividade descreve a capacidade do modelo de rejeitar amostras de todas as outras classes.

Em um modelo de PLS-DA, uma amostra pertencente a classe 1 corretamente classificada pelo modelo como sendo de classe 1, é chamada de amostra verdadeira positiva (VP). Já, quando uma amostra pertencente a classe 0 é classificada como sendo pertencente a classe 1, essa amostra é chamada de falso positivo (FP). Por outro lado, quando uma amostra pertencente a classe 0 é classificada corretamente pelo modelo PLS-DA como sendo de classe 0, essa amostra é chamada de verdadeira negativa (VN), ao passo que uma amostra pertencente a classe 1 classificada erradamente como sendo de classe 0, é chamada de amostra falsa negativa (FN).

Sendo assim, a sensibilidade do modelo para uma determinada classe é definida como a habilidade do modelo em corretamente reconhecer amostras pertencentes àquela classe, sendo calculada utilizando a Equação 1.

$$\text{Sensibilidade} = \text{VP}/(\text{VP}+\text{FP}) \quad (\text{Equação 1})$$

Por outro lado, a seletividade do modelo para uma determinada classe é a habilidade de rejeitar amostras de todas as outras classes, sendo calculada pela Equação 2.

$$\text{Seletividade} = \text{VN}/(\text{VN}+\text{FP}) \quad (\text{Equação 2})$$

Os valores de sensibilidade e seletividade do modelo para cada classe variam de 0 a 1, quanto mais próximo a 1 mais bem ajustado o modelo se apresenta para aquela classe.

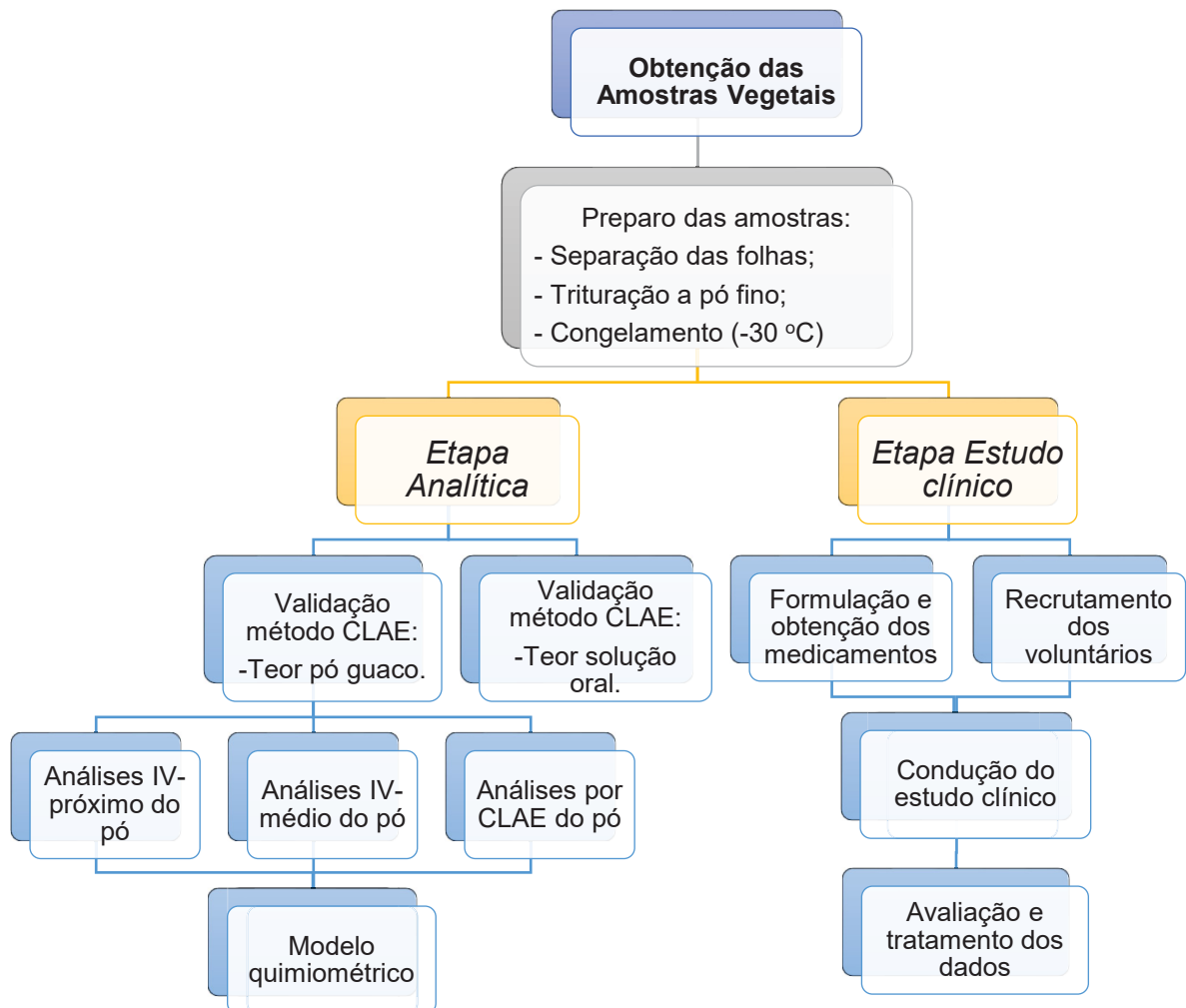
Finalmente, após a construção dos modelos PLS-DA, é importante realizar a análise gráfica da Variável Importante na Projeção (VIP). Esse gráfico demonstra a importância de cada variável original para a separação das classes. O objetivo dessa avaliação é reconhecer essas variáveis importantes para uma análise crítica da separação alcançada, além de permitir aumentar a eficiência do modelo ao eliminar variáveis não informativas. As variáveis com escores maiores que 1 são consideradas as principais variáveis do modelo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

A pesquisa seguiu duas etapas principais, assim denominadas: 1) Etapa analítica; 2) Etapa estudo clínico.

FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS SEGUIDAS NA PESQUISA



4.2 AMOSTRAS VEGETAIS

Para a orientação, construção do modelo quimiométrico e preparo das soluções orais para condução estudo clínico, foram utilizadas amostras das espécies *M. glomerata* e *M. laevigata* obtidas do viveiro do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

No total foram obtidos 6 exemplares de *M. glomerata* e 18 exemplares de *M. laevigata*. Exsicatas de todas as amostras estão depositadas no Herbário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEN), ANEXO 1.

Para fins de introdução de maior variabilidade ao modelo quimiométrico construído para diferenciação entre as duas espécies de *Mikania*, foram adquiridas amostras das plantas em ervanários do estado do Paraná, São Paulo, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, além de coletas em campo de amostras localizadas nos estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo, totalizando 49 amostras.

Folhas de outras espécies vegetais – *Annona muricata* L., *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, *Malva sylvestris* L., *Mikania hirsutissima* D.C. e *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reissek) Biral (sin. *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek), totalizando 5 amostras, foram adquiridas em ervanários locais para desafiar o modelo de classificação quimiométrico.

4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS VEGETAIS

As amostras foram primeiramente selecionadas e separadas de materiais estranhos ou partes indesejadas, como talos.

As folhas foram trituradas em moinho do tipo facas (modelo START FT-50—Fortinox) e padronizadas em peneira com tamanho de partícula inferior a 0,60 mm.

Para evitar a contaminação por micro-organismos e possíveis alterações nos metabólitos secundários devido a reações enzimáticas o pó das folhas foi armazenado em freezer (-30 °C) até o momento do uso para análise cromatográfica, espectrométrica ou preparo das tinturas para os medicamentos.

4.4 CONSTRUÇÃO DO MODELO QUIMIOMÉTRICO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE GUACO

4.4.1 Padrões analíticos e reagentes para análise cromatográfica

Padrões de ácido clorogênico, ácido 3,5 dicafeoilquínico e ácido caurenóico foram fornecidos pela empresa PhytoLab, uma parte do ácido caurenóico também foi isolado e doado pelo CPQBA. Ácido *o*-cumárico foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich, cumarina foi adquirida da empresa Chromadex. A acetonitrila grau CLAE foi adquirida da empresa J. T. Baker, já o ácido fosfórico, etanol 96% (v/v) e metanol foram obtidos da empresa Reatec.

4.4.2 Análise por CLAE do pó das plantas e validação do método analítico

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento Agilent 1260 equipado com injetor automático, termostato de coluna e detector de arranjo de diodos (DAD), operado através do software OpenLab EZChrom. O método utilizado foi o previamente descrito por Agostini-Costa e colaboradores (2016), a separação cromatográfica foi alcançada com uma coluna Ace C18, 250 x 4,6 mm – 5 µm de tamanho de partícula. As fases móveis utilizadas foram ácido *o*-fosfórico 0,1% em água e acetonitrila em gradiente, conforme TABELA 1.

TABELA 1 – GRADIENTE UTILIZADO NA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

TEMPO (min)	FLUXO (mL/min)	ÁCIDO O-FOSFÓRICO 0,1% (%)	ACETONITRILA (%)
0	1,00	84	16
12	1,00	80	20
22	1,00	70	30
35	1,00	10	90
36	1,00	0	100
48	1,00	0	100
49	1,00	84	16
52	1,00	84	16

A detecção dos metabólitos secundários foi realizada respeitando o máximo de absorção de cada grupo químico, derivados do ácido cafeico foram monitorados

em 330 nm, derivados do ácido cinâmico foram monitorados em 274 nm e diterpenos do tipo caureno foram monitorados em 210 nm.

Os padrões foram diluídos em metanol nas faixas de concentrações apresentadas no TABELA 2.

TABELA 2 – FAIXA DOS PADRÕES PARA AS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

SUBSTÂNCIA	FAIXA DE CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	DETECÇÃO (nm)
Ácido clorogênico	1,0 a 120	330
Ácido 3,5 dicafeoilquínico	5,5 a 470	330
Cumarina	0,2 a 200	274
Ácido O-cumárico	0,2 a 150	274
Ácido caurenóico	0,2 a 150	210

Foram construídas curvas de calibração externa para cada uma das substâncias de referência utilizadas e os respectivos picos de interesse observados nas amostras foram calculados frente a essas curvas.

As amostras do pó da planta foram preparadas para análise pela extração de 500 mg com 50 mL de etanol 70% (v/v) por 20 min em ultrassom.

Todas as amostras e padrões analíticos foram filtrados em 0,45 µm por membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) previamente a injeção de 10 µL no sistema cromatográfico.

A validação do método analítico foi realizada de acordo com a legislação brasileira vigente, RDC 166 de 24 de julho de 2017 (BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

Os dados foram avaliados e tratados pelo software Minitab® 17.1.017 (LEAD Technologies, Inc.).

4.4.3. Análise dos dados de teor para orientação do modelo quimiométrico

Para orientação dos modelos quimiométricos montados com os espectros de infravermelho, os teores de cumarina e ácido clorogênico das amostras de guaco adquiridas no comércio e coletadas no campo foram comparados às amostras de *M. glomerata* e *M. laevigata* obtidas do CPQBA (ALMEIDA *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2018).

As amostras obtidas do CPQBA por sua vez foram divididas em dois grupos, *M. glomerata* com identificação botânica (GI) e *M. laevigata* com identificação botânica (LI).

Assim, a média dos teores em triplicata dessas moléculas para cada amostra foi comparada através da análise de variância (ANOVA) à média obtida para as mesmas moléculas nos grupos GI e LI. Os testes foram realizados separadamente para cada molécula e em etapas.

Primeira etapa – Um primeiro teste ANOVA foi aplicado para comparar o teor de cumarina de uma determinada amostra não identificada aos resultados obtidos para cumarina do grupo GI. Amostras com $p < 0,05$ nesta primeira comparação foram alocadas diretamente em um grupo de amostras denominado *M. laevigata* sem identificação botânica (LNI);

Segunda etapa – Amostras com $p > 0,05$ no primeiro teste foram submetidas a um segundo teste ANOVA. Esse foi realizado para comparar o teor de ácido clorogênico dessas amostras ao grupo GI. Amostras com $p > 0,05$ nessa comparação foram alocadas no grupo *M. glomerata* sem identificação botânica (GNI);

Terceira etapa – Amostras com $p < 0,05$ no segundo teste foram submetidas a um terceiro teste ANOVA. Esse último teste foi realizado para comparar o conteúdo de cumarina dessas amostras ao grupo LI. Amostras com $p < 0,05$ nessa última comparação foram diretamente alocadas ao grupo GNI, caso contrário, então a amostra foi alocada para o grupo LNI.

Os dados foram avaliados e tratados pelo software Minitab® 17.1.017 (LEAD Technologies, Inc.).

4.4.4 Análise por infravermelho das amostras de guaco

A análise do pó das folhas de cada amostra foi realizada em triplicata.

As análises de IV-médio foram realizadas em um equipamento Bruker modelo Alpha-P, operado através do software OPUS e equipado com o módulo de ATR (*attenuated total reflectance*). Os espectros foram obtidos no modo de transmitância entre 4.000 e 375 cm^{-1} , a resolução utilizada foi de 4 cm^{-1} e taxa de 24 scans/espectro. Foi realizado zero antes da leitura de cada replicata.

As análises de IV-próximo foram realizadas em um equipamento Bruker modelo TENSOR 37, operado através do software OPUS-Operator e equipado com o módulo de reflectância difusa. Os espectros foram obtidos no modo de absorbância entre 10.000 e 4.000 cm^{-1} , a resolução utilizada foi de 4 cm^{-1} e taxa de 64 scans/espectro. Foi realizado zero antes da leitura de cada replicata.

4.4.5 Construção dos modelos quimiométricos para reconhecimento de padrões / identificação das espécies

Os espectros obtidos por infravermelho médio e próximo foram primeiramente avaliados de forma separada através de análise exploratória por PCA.

Nessa etapa o pré-tratamento utilizado foi o GLSW, para o qual foi definido um fator de atenuação (α) de 0,01 aplicado de forma automática.

Na análise exploratória dos dados foram avaliadas a distribuição das amostras, verificada a presença de *outliers* e observada a contribuição das variáveis para separação das amostras.

Os mesmos dados foram utilizados para montar um modelo de classificação e predição usando PLS-DA.

Nessa etapa os espectros de IV-médio foram utilizados em toda a faixa de número de ondas em que foram adquiridos - 4.000 a 375 cm^{-1} , já os espectros de IV-próximo foram utilizados na faixa de 7.000 a 4.000 cm^{-1} .

O pré-tratamento utilizado foi o GLSW, para o qual foi definido um fator de atenuação (α) de 0,01 aplicado no bloco X das classes.

As classes utilizadas para o modelo PLS-DA – *M. glomerata* (G) – 28 amostras, *M. laevigata* (I) – 57 amostras e outras espécies vegetais (O) – 5 amostras, utilizadas para desafiar o modelo quimiométrico – foram orientadas pelas análises químicas por CLAE. Com exceção da classe outras espécies que reuniu as amostras de *Mikania hirsutissima*, *Malva sylvestris*, *Maytenus ilicifolia*, *Annona muricata* e *Camellia sinensis*, para o agrupamento das demais amostras nas outras duas classes foram utilizadas os resultados dos teores obtidos para cumarina e ácido clorogênico conforme explicado no item 4.4.3 (ALMEIDA *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2018).

Assim, a classe *M. glomerata* reuniu as amostras que possuíam identificação botânica (GI) e as amostras que não possuíam identificação botânica (GNI), mas que

pela comparação dos teores de cumarina e ácido clorogênico ao grupo GI foram similares a esse. Da mesma forma, na classe *M. laevigata* foram alocadas as amostras que possuíam identificação botânica (LI) e as amostras que não possuíam identificação botânica (LNI), mas que pela comparação dos teores de cumarina e ácido clorogênico ao grupo LI foram similares a esse.

Para os dois modelos construídos, foi realizada a validação interna dos dados utilizando o método *venetian blinds* com 5 grupos.

Foram removidas aleatoriamente 30% das amostras (81 espectros) de cada uma das classes para validação externa do modelo PLS-DA, compondo assim o conjunto externo de validação. Já os 70% de amostras restante (189 espectros) foi utilizado como conjunto de calibração.

O conjunto de calibração foi monitorado quanto à presença de amostras anômalas através dos parâmetros estatísticos da influência ou alavancagem (*leverage*) e resíduo de Student. Para o resíduo de Student foi adotado o intervalo padrão de $\pm 2,0$. Já para o *leverage* crítico foi considerado o número de espectros do conjunto de calibração, 189, para realização do cálculo conforme preconizado pela Associação Americana de Testes e Materiais (ASTM, 2017).

$$\text{Leverage crítico} = VLs \times 3/n \quad (\text{Equação 3})$$

onde:

VLs – número de variáveis latentes definidas para o modelo;

n – número de amostras do conjunto de calibração.

Amostras que apresentaram valores no gráfico resíduos de Student Vs *leverage* acima dos dois limites definidos foram removidas do modelo (FERREIRA, 2015).

Foram definidas duas variáveis latentes (VL) como número adequado para o melhor ajuste do modelo, para isso foram considerados os menores valores da raiz da média quadrática de validação cruzada (RMSECV).

Já a capacidade preditiva do modelo foi avaliada considerando os valores de sensibilidade e seletividade para cada classe.

Todas as análises quimiométricas foram realizadas utilizando PLS Toolbox 2.0 (Eigenvector Research, Wenatchee, WA, USA) operando no software Matlab 7.0.1 (Mathworks, Sherborn, MA, USA).

4.5 MATERIAIS PARA O ESTUDO CLÍNICO

4.5.1 Matérias-primas utilizadas na produção das tinturas e soluções orais

O álcool de cereais foi utilizado da empresa Reatec, a água foi utilizada grau farmacêutico, o sorbato de potássio foi utilizado da empresa Valdequímica, a sucralose foi obtida da empresa M. Cassab e o sorbitol 70 utilizado da marca Volp.

4.5.2 Obtenção das tinturas de guaco

O preparo das tinturas a partir das duas espécies vegetais de guaco foi realizado com uma relação de 1 parte, em massa, de droga vegetal para obtenção de 5 partes, em volume, da tintura, conforme descrito pela Farmacopeia Brasileira VI (2019) e monografia para *M. laevigata* presente na segunda edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (2021).

Assim, 340 g do pó de cada espécie foram extraídos com 1,7 L de etanol 70% (v/v) em ultrassom por 20 min. Ao término da extração a tintura foi centrifugada para separar o pó da planta da tintura e filtrada a vácuo por papel de filtro quantitativo. O filtrado foi avolumado para 1,7 L com água, tendo sido obtido ao final uma tintura com 52% (v/v) de etanol.

4.5.3 Obtenção das soluções orais

As soluções orais de guaco foram formuladas a partir das tinturas produzidas com cada espécie *M. glomerata* e *M. laevigata*. Na TABELA 3 é apresentada a composição centesimal de cada formulação.

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES ORAIS UTILIZADAS NO ESTUDO CLÍNICO

COMPONENTE	SOLUÇÃO ORAL <i>M. glomerata</i> (g)	SOLUÇÃO ORAL <i>M. laevigata</i> (g)
Tintura de <i>M. glomerata</i>	10	N.A.
Tintura de <i>M. laevigata</i>	N.A.	10
Sorbato de potássio	0,3	0,3
Sucralose	0,06	0,06
Sorbitol	34,94	34,94
Água	54,7	54,7
TOTAL	100	100

NOTA: N.A. – não aplicável.

Os medicamentos formulados para o estudo clínico atenderam aos requisitos farmacotécnicos definidos pelo compêndio nacional vigente com relação a proporção de tintura presente no medicamento (BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2021).

4.5.4. Análise por CLAE das tinturas, soluções orais e validação do método analítico

A tintura de guaco foi preparada para análise através da diluição de 2 mL para um volume final de 10 mL com etanol 70% (v/v).

A solução oral de guaco foi preparada para análise através da diluição de 6 mL para um volume final de 10 mL com etanol 70% (v/v).

As análises cromatográficas foram realizadas conforme condições descritas no item 4.4.2.

A validação do método analítico foi realizada para as soluções orais de guaco de acordo com a legislação brasileira vigente, RDC 166 de 24 de julho de 2017 (BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

Os dados foram avaliados e tratados pelo software Minitab® 17.1.017 (LEAD Technologies, Inc.).

4.6 ESTUDO CLÍNICO

O estudo clínico foi submetido ao comitê de ética número 102, vinculado ao Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, sob o número de registro 53741621.4.0000.0102 e aprovado com o parecer número 5.294.041.

4.6.1 Seleção dos voluntários

Os voluntários foram selecionados através de divulgação em redes sociais e contato direto com potenciais candidatos ao estudo. Os critérios de inclusão e exclusão adotados seguem listados abaixo.

1) Critérios de inclusão:

- Indivíduos do sexo masculino ou feminino;
- Idade entre 18 e 50 anos;

2) Critérios de exclusão:

- Histórico de acidente vascular cerebral ou infarto agudo do miocárdio nos últimos três meses;
- Presença de aneurisma de aorta;
- Pressão arterial sistólica > 200 mmHg e pressão arterial diastólica > 100 mmHg;
- Portadores de epilepsia;
- Pessoas incapazes de compreender o procedimento de realização e implicações do estudo;
- Mulheres grávidas ou em período de amamentação;
- Fumantes.

Aos voluntários triados foram explicadas todas as etapas da pesquisa incluindo os riscos e benefícios. Os voluntários que concordaram em participar do estudo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os voluntários também foram informados de que a pesquisa não possuía fins lucrativos, apenas acadêmicos, e que não receberiam nenhum tipo de pagamento pela sua participação.

O tamanho amostral foi estipulado de maneira a possibilitar a confirmação da segurança dos fitoterápicos, caso ela exista. O n foi calculado com base no estudo de Soares e colaboradores (2006), que utilizou 24 participantes, resultando em coeficiente de variação (CV) médio de 21% nos resultados reportados no estudo. Assim, esse n de 24 e esse CV de 21% foram aplicados na equação abaixo (CHOW; WANG, 2001).

$$n \geq \left[t(a, 2n-2) + t\left(\frac{(1-b)}{2}, 2n-2\right) \right]^2 \times \left(\frac{CV}{20}\right)^2 \quad (\text{Equação 4})$$

onde:

a – nível de significância (0,05);

b – poder do teste (0,8);

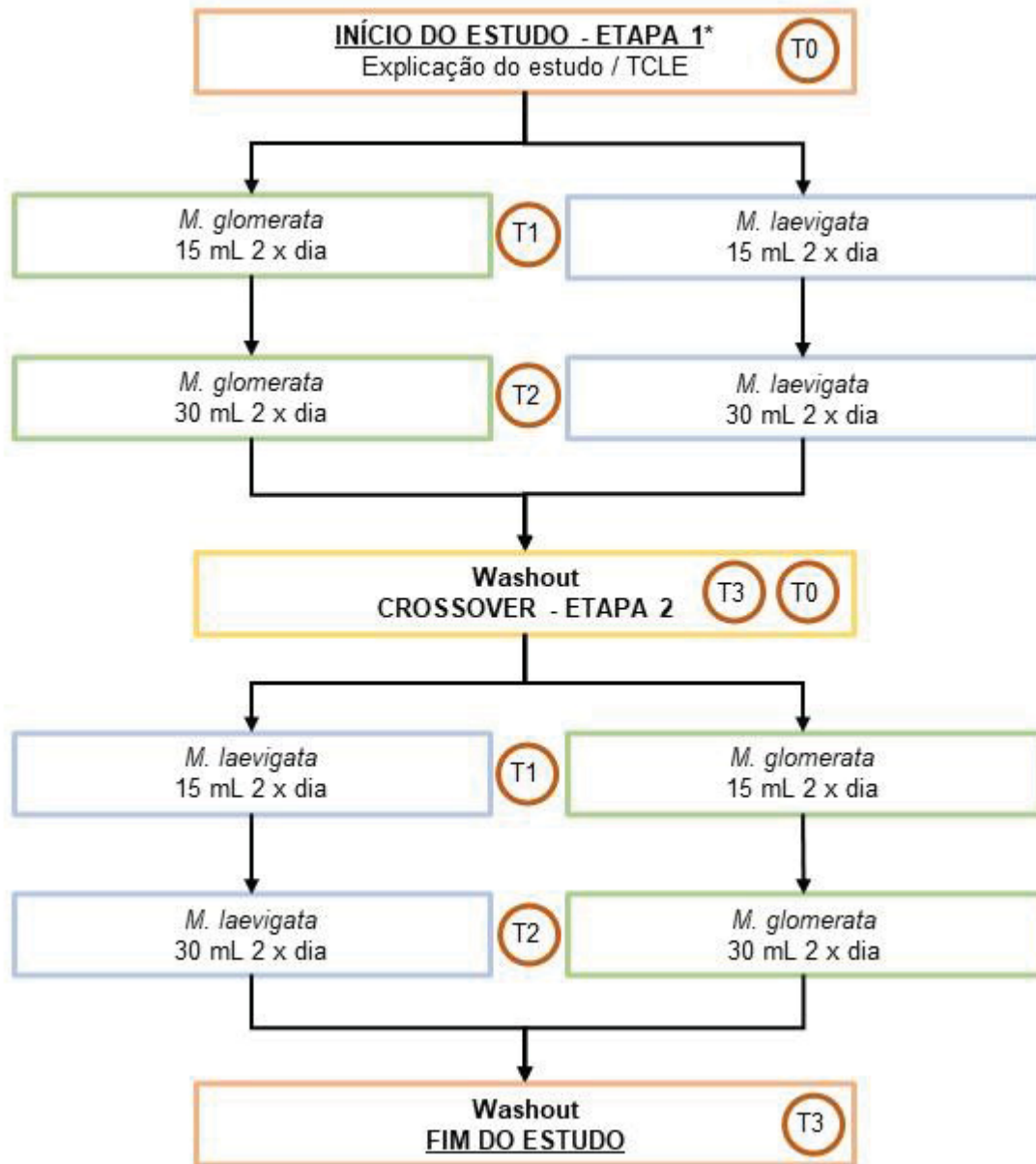
CV – coeficiente de variação (21).

Portanto, o número alvo de indivíduos recrutados para o estudo foi de 15 voluntários.

4.6.2 Desenho do estudo clínico

O estudo clínico foi dividido em duas etapas, a primeira etapa consistiu na passagem do voluntário pelo primeiro grupo intervenção no qual foi randomicamente inserido, já a segunda etapa foi iniciada após a troca do voluntário para o outro grupo intervenção (*crossover*), conforme FIGURA 7.

FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DA PESQUISA CLÍNICA



LEGENDA: *A partir do início, cada caixa representa 1 fase da pesquisa com duração de 1 semana. Antes de cada fase e ao final do estudo os voluntários foram ao laboratório para responder ao questionário clínico (Anexo 3), medição da pressão arterial e coleta de sangue.

Para o início do estudo o voluntário selecionado foi convidado a se dirigir ao laboratório responsável pelas coletas de sangue para iniciar a primeira etapa da pesquisa. Na primeira visita cada voluntário respondeu aos questionários de coleta de dados dos voluntários (Anexo 2) e ao questionário para avaliação clínica do voluntário (Anexo 3). Após a resposta aos questionários foi realizada a medição da pressão arterial e coleta de sangue para análises laboratoriais, este foi denominado de tempo zero da pesquisa (T0).

Após a coleta do sangue o voluntário foi incluído de forma randômica em um dos dois grupos da pesquisa, intervenção 1 (Solução oral de *M. glomerata*) ou intervenção 2 (Solução oral de *M. laevigata*). Para essa randomização foi utilizada a função ALEATÓRIOENTRE do Microsoft Excel 365. Quando a função retornou o número 1 o voluntário foi alocado no grupo intervenção 1, quando a função retornou o número 2 o voluntário foi alocado no grupo intervenção 2. A partir desse momento foi iniciado o uso da medicação.

O voluntário recebeu a solução oral produzida a partir da espécie do grupo intervenção no qual foi randomicamente alocado. Durante quatorze dias os voluntários fizeram o uso da solução oral de guaco duas vezes ao dia, nos primeiros sete dias 15 mL a cada 12 h e nos sete dias finais 30 mL a cada 12 h.

Ao término dos primeiros sete dias de uso, os voluntários retornaram ao laboratório para realizar novamente a coleta de sangue, resposta ao questionário de avaliação clínica e aferição da pressão arterial, denominado tempo um (T1). A dose foi aumentada conforme descrito no parágrafo anterior e o voluntário permaneceu utilizando a medicação. Após sete dias o voluntário retornou ao laboratório, para nova coleta de sangue, resposta ao questionário de avaliação clínica e aferição da pressão arterial, denominado tempo dois (T2). Nessa visita a utilização da medicação em teste foi suspensa durante uma semana para permitir a completa eliminação dos metabólitos secundários do guaco do organismo (*washout*), antes de ocorrer a troca do usuário para o outro grupo da pesquisa (*crossover*).

Após o tempo de *washout*, os voluntários retornaram para nova visita ao laboratório, denominado tempo três (T3), foram avaliados para os parâmetros já citados como forma de avaliar se qualquer alteração ocorrida em algum dos marcadores de sangue ou sinais clínicos voltaria ao normal, bem como servir de parâmetros iniciais para o novo grupo que o voluntário foi alocado (T0).

Nessa quarta visita foi encerrada a primeira etapa da pesquisa e então o voluntário foi trocado de grupo, se estava no grupo “intervenção 1” passou para o grupo “intervenção 2” e vice-versa, realizando assim o *crossover* dos grupos e início da segunda etapa da pesquisa.

O uso da medicação foi retomado no mesmo esquema posológico descrito anteriormente. Ao término de cada semana de uso, os voluntários retornaram ao laboratório, realizaram a coleta de sangue, resposta ao questionário e aferição da pressão arterial, tempos um e dois do segundo grupo que estavam inseridos (T1 e

T2). Finalmente, na última semana o voluntário teve o uso da medicação suspenso e retornou após sete dias para a última visita (sétima visita) quando então foram avaliados conforme já descrito e liberados da pesquisa, dando origem ao tempo três do segundo grupo (T3).

4.6.3 Monitoramento da segurança do guaco

O monitoramento da segurança das soluções orais de guaco foi realizado através de três formas:

- 1) Monitoramento de eventos adversos – realizado através de questionário autoaplicável em todas as visitas dos voluntários ao laboratório (Anexo 3). Avaliada a resposta dos voluntários para o número de eventos adversos observados ao longo da semana de tratamento. Os eventos listados no questionário tiveram como objetivo monitor a ação do guaco sobre alguns sistemas alvo no corpo humano conforme orientado pela OMS. Esses sistemas compreendem:

- Neurológico;
- Pele;
- Musculoesquelético;
- Gastrointestinal;
- Cardiovascular.

Os voluntários assinalaram no questionário se foi observado algum efeito ao longo da semana em um dos sistemas descritos anteriormente, bem como o número de episódios observados. Esse mesmo questionário serviu como registro para outros eventos adversos ocorridos durante o estudo (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008);

- 2) Medição da pressão arterial – realizada em todas as visitas dos voluntários ao laboratório. Utilizado medidor de pressão arterial de pulso homologado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO);
- 3) Análises de sangue dos voluntários – realizada em todas as visitas dos voluntários ao laboratório. Avaliados parâmetros de sangue hematológicos, bioquímicos e imunológicos.

Hematológicos – hemograma completo e coagulograma para avaliar eventuais efeitos tóxicos no sistema hematopoiético.

Bioquímicos – ALT, AST, GGT, ALP, bilirrubina, creatinina, ureia, albumina, proteína total, glicemia, colesterol, triglicerídeos, sódio e potássio. O objetivo foi monitorar possível efeito tóxico do guaco nos sistemas alvo fígado, rins e sistema endócrino.

Imunológico – histamina foi monitorada com o intuito de avaliar possível atividade anti-inflamatória do guaco para direcionamento de estudo fase II. Esse foi o único parâmetro analisado somente nos T0 e T2 das duas etapas dos estudo clínico.

Todas as coletas de sangue e análise dos parâmetros mencionados foi realizada no laboratório Laboran Análises Clínicas, tendo ocorrido em sete momentos da pesquisa para cada voluntário, início do estudo, entre cada uma das etapas do estudo e ao término dele.

4.6.4 Avaliação dos eventos adversos

Os eventos adversos registrados foram avaliados em duas etapas.

Primeiramente foram classificados em três níveis de intensidade conforme metodologia aplicada por Tavares (2005) e Selvi e colaboradores (2022):

- 1) Leves - voluntário percebeu os sintomas ou sinais, porém foram facilmente tolerados e não limitaram as atividades diárias;
- 2) Moderados - o desconforto do voluntário foi suficiente para causar interferência nas suas atividades diárias normais;
- 3) Severo – voluntário foi incapacitado de realizar atividades normais.

Em seguida, foi estabelecido se havia ou não uma relação de causalidade dos eventos adversos à intervenção realizada conforme descrito abaixo.

- 1) Atribuído – quando existiam evidências científicas previamente reportadas sobre o evento, o evento seguiu uma sequência temporal razoável a partir da administração da intervenção, houve melhora no estado clínico ao suspender uso do medicamento e/ou reaparição dos sintomas após nova utilização;

- 2) Provável – quando existiam evidências científicas previamente reportadas sobre o evento, a relação temporal entre o evento e a administração do medicamento foi sugestiva, não existiram eventos alternativos que poderiam ter ocasionado o evento adverso, houve melhora no estado clínico ao suspender uso do medicamento, mas não reaparição dos sintomas após nova utilização;
- 3) Possível – quando não existiam evidências científicas previamente reportadas sobre o evento, ocorreu alguma relação temporal entre o evento e a administração da intervenção, existiram eventos alternativos que poderiam ter ocasionado o evento adverso, não houve melhora no estado clínico ao suspender uso do medicamento e os sintomas não reapareceram após nova utilização;
- 4) Não atribuído – quando existiam provas suficientes para concluir que a etiologia não estava relacionada ao medicamento, não ocorreu relação temporal entre o evento e a administração da intervenção, existiram eventos alternativos que poderiam ter ocasionado o evento adverso, não houve melhora no estado clínico ao suspender uso do medicamento e os sintomas não reapareceram após nova utilização.

Essa última classificação permitiu a vinculação ou não do evento adverso às soluções orais de guaco.

4.6.5 Avaliação e tratamento dos dados de pressão arterial e análises do sangue dos voluntários

Os valores obtidos para os marcadores analisados no sangue dos voluntários e pressão arterial foram avaliados estatisticamente quanto à influência do tempo na sua variação. Essa avaliação foi conduzida separadamente para cada espécie de guaco investigada no estudo

Dentro de cada grupo intervenção os dados foram separados em quatro tempos de análise:

T0 – comparador inicial sem o uso da medicação;

T1 – após a primeira semana de uso da medicação 15 mL / 2 vezes ao dia;

T2 – após a segunda semana de uso da medicação 30 mL / 2 vezes ao dia;

T3 – após uma semana da suspensão do uso da medicação.

Os resultados para os marcadores de segurança de todos os voluntários dentro de um mesmo grupo intervenção nos tempos 0, 1, 2 e 3 foram comparadas através do teste semiparamétrico GEE – *Generalized estimating equations* ou equação de estimativa generalizada – aplicado para medidas pareadas repetidas (LI *et al.*, 2022; WANG, 2014).

Primeiramente as variáveis dependentes monitoradas, parâmetros do sangue e medidas de pressão arterial, foram avaliadas quanto à medida de aderência para medidas repetidas através do valor de QIC – *Quasi-likelihood under independence model criterion* ou quasi-verossimilhança sob o modelo de independência (WANG, 2014). As variáveis contínuas foram avaliadas nos tipos de distribuição linear, gamma e tweedie. Já as variáveis discretas foram avaliadas frente aos tipos de distribuição Poisson, gamma e tweedie.

O tipo de distribuição escolhido para a sequência do teste foi aquele que apresentou o menor valor de QIC, sendo essa a distribuição para a qual a variável apresentou melhor aderência.

O modelo de distribuição que melhor representou o parâmetro foi então utilizado para avaliar o efeito do tempo, variável independente, sobre os resultados do parâmetro, variável dependente.

A avaliação do efeito do tempo sobre o parâmetro foi realizada considerando o valor de p para o efeito do tempo com um nível de confiança de 95%, parâmetros que apresentaram $p < 0,05$ demonstraram sofrer influência do tempo e então foram avaliados em uma segunda etapa.

A segunda etapa procurou verificar qual tempo apresentava variação em relação ao T0, para isso foi avaliada a diferença média entre os tempos do parâmetro (β) e os respectivos intervalos de confiança (IC), sendo considerado o valor de p das comparações entre os tempos, todos com um nível de confiança de 95%.

Além disso, nessa segunda etapa, foram conduzidos testes *post hoc* de Sidak para comparação dos diferentes pares de resultados de tempo – T0/T1, T0/T2, T0/T3, T1/T2, T1/T3, T2/T3. Novamente foi considerado o valor de p em um nível de significância de 5% para comparação dos pares de média.

Para o parâmetro imunológico histamina, foi utilizada uma segunda abordagem para validar o resultado obtido pela avaliação através de GEE. Considerando que existiam apenas dois tempos a serem comparados por espécie – T0 e T2, também foi realizada a avaliação das médias desses tempos pelo teste t pareado considerado um nível de significância de 5%.

Todas as análises estatísticas foram efetuadas no software IBM SPSS Statistics 20.0

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A revisão de literatura realizada demonstrou a dificuldade atualmente existente para a correta identificação das duas espécies de *Mikania* tradicionalmente conhecidas como guaco, *M. glomerata* e *M. laevigata*. Isso remete a necessidade de métodos que permitam a correta e confiável diferenciação entre duas espécies, como forma de favorecer que os estudos realizados com o guaco sejam adequadamente orientados quanto à espécie utilizada, além de fomentar a comercialização e conseqüentemente o uso pela população das espécies corretamente identificadas.

Além disso, os estudos apresentados na revisão apontam para a importância da correta identificação dessas espécies considerando as diferenças no metabolismo secundário e nas ações farmacológicas monitoradas. Logo, estudos clínicos são imprescindíveis para avaliar cada uma das espécies separadamente e determinar a segurança e eficácia de cada uma delas.

Os resultados desta seção são apresentados de forma a detalhar no item 5.1 as análises químicas realizadas para a criação de dois modelos quimiométricos para a diferenciação entre as duas espécies de guaco. Já no item 5.2 são apresentados os resultados obtidos para o estudo clínico desenvolvido como forma de avaliar a segurança das soluções orais de *M. glomerata* e *M. laevigata*.

5.1 CONSTRUÇÃO DO MODELO QUIMIOMÉTRICO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE GUACO

5.1.1 Validação do método analítico para o teor dos metabólitos secundários nas amostras de guaco

O método analítico utilizado foi o previamente reportado Agostini-Costa e colaboradores (2016), no trabalho citado foi realizada a validação do método analítico para os marcadores ácido o-cumárico, cumarina e ácido caurenóico nas faixas de 0,2 a 200 µg/mL para a cumarina e 0,2 a 150 µg/mL para as duas outras moléculas.

Portanto para a matriz do pó das folhas foram validados os marcadores quantificados no presente trabalho, mas não validados pelos autores citados.

Desta forma, foi conduzida a validação do método para o ácido clorogênico e ácido 3,5 dicafeoilquínico.

A validação conduzida procurou cobrir a faixa de variação dessas duas moléculas nas amostras analisadas das duas espécies de guaco. Assim, a faixa validada do método cobriu 0,01 a 1,20% de ácido clorogênico e 0,05 a 5,00% de ácido 3,5 dicafeoilquínico na amostra.

No QUADRO 4 são apresentados os parâmetros avaliados, os critérios de aceitação e os resultados obtidos na validação do método analítico para as duas moléculas.

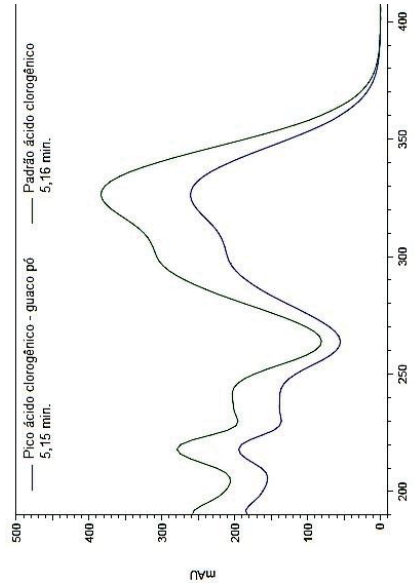
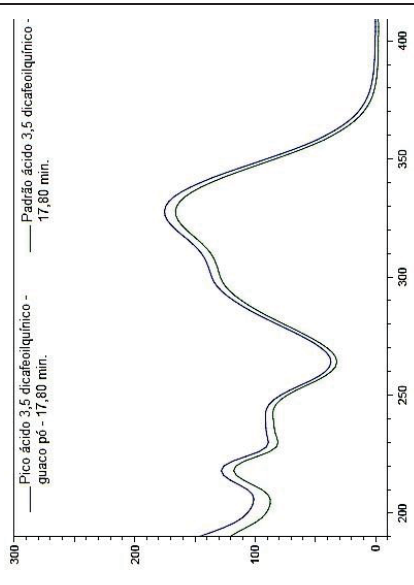
Os critérios de aceitação definidos para os parâmetros avaliados tiveram como base o Apêndice F das Diretrizes para requisitos de performance de método padrão publicado pela AOAC (AOAC, 2016).

Os resultados apresentados demonstram a confiabilidade do método analítico para quantificação das moléculas ácido clorogênico e ácido 3,5 dicafeoilquínico, nas amostras de guaco, além de cumarina, ácido o-cumárico e ácido caurenóico previamente validados pelos autores citados.

Esse resultado é importante pois até o momento não existe na literatura um método analítico descrito capaz de quantificar por CLAE com detecção por ultravioleta as cinco moléculas utilizadas nesse trabalho.

O monitoramento dessas moléculas é necessário para fins de distinção entre as duas espécies de guaco, como será discutido no próximo item, além de serem moléculas com potencial ação farmacológica conforme apresentado na revisão de literatura.

QUADRO 4 – RESULTADOS VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-DAD NA MATRIZ PÓ DAS FOLHAS DE GUACO

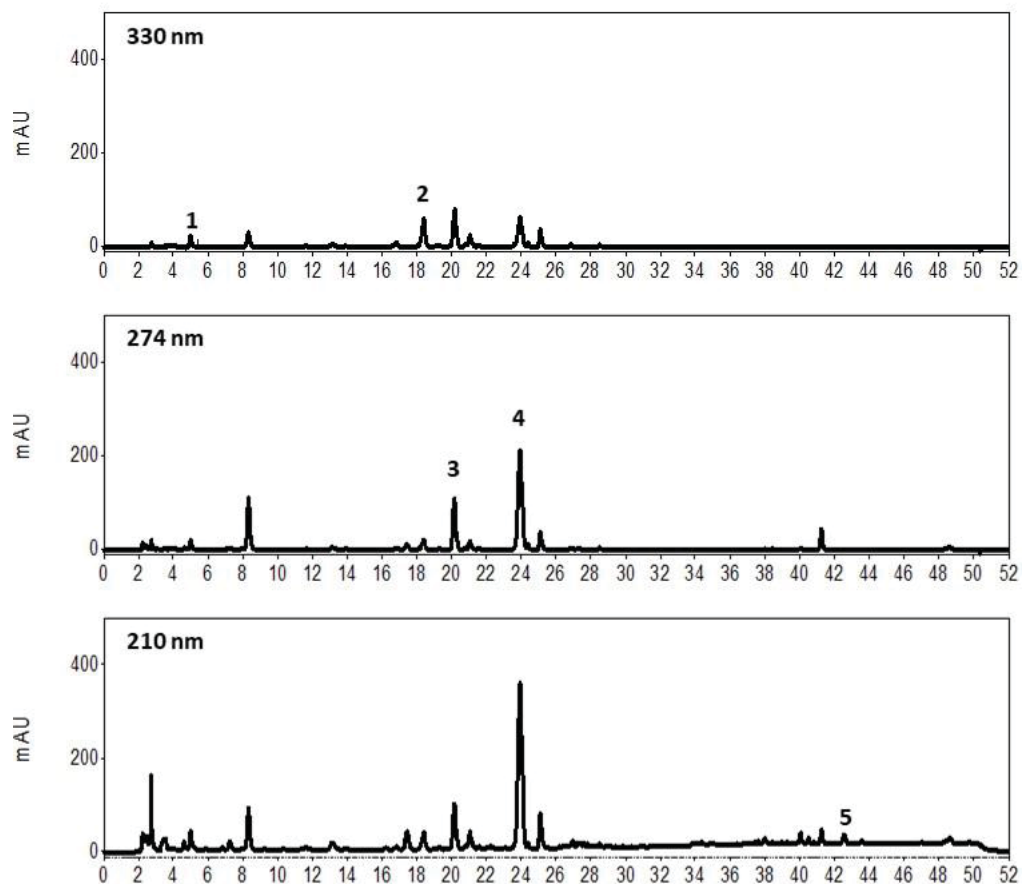
PARÂMETRO	CIRITÉRIO DE ACEITAÇÃO	RESULTADO ÁCIDO CLOROGÊNICO	RESULTADO ÁCIDO 3,5 DICAFEILOQUÍNICO
Seletividade	<p>- Similaridade do perfil do espectro do pico de interesse na amostra ao padrão de referência.</p> <p>- Pureza de pico > 0,992</p> <p>- Paralelismo entre as curvas da amostra adicionada de padrão e a curva do padrão – $t_{calc} < t_{crit}$</p>	<p>- Perfis similares</p>  <p>- Pureza de pico – 0,998 - $t_{calc} = 0,718 / t_{crit} = 2,056$</p>	<p>- Perfis similares</p>  <p>- Pureza de pico – 0,999 - $t_{calc} = 1,543 / t_{crit} = 2,056$</p>
Linearidade	<p>Avaliado em 3 curvas de 5 pontos</p> <p>- $r > 0,990$</p> <p>- Ajuste do modelo - $F_{calc} > F_{crit}$</p> <p>- Intercepto - $p > 0,05$</p> <p>- Coeficiente angular - $p < 0,05$</p> <p>- Resíduos aleatórios</p>	<p>- $r = 0,997$</p> <p>- $F_{calc} = 2881 / F_{crit} = 4,67$</p> <p>- Intercepto $p = 0,92$</p> <p>- Coeficiente angular $p = 1,21 \times 10^{-15}$</p> <p>- Resíduos aleatórios</p>	<p>- $r = 0,998$</p> <p>- $F_{calc} = 2648 / F_{crit} = 4,67$</p> <p>- Intercepto $p = 0,99$</p> <p>- Coeficiente angular $p = 2,07 \times 10^{-16}$</p> <p>- Resíduos aleatórios</p>
Repetibilidade	Seis amostras 100% - CV < 3,0%	- CV = 2,40%	- CV = 2,90%
Precisão intermediária	Doze amostras 100% - CV < 5,0%	- CV = 4,49%	- CV = 4,27%
Exatidão	<p>Triplicata de três concentrações – baixa, média e alta.</p> <p>- Recuperação 95 a 105%</p>	<p>- Baixa (1,0 µg/mL) – 96,3%</p> <p>- Média (55,0 µg/mL) – 99,7%</p> <p>- Alta – (120 µg/mL) – 97,0%</p>	<p>- Baixa (5,5 µg/mL) – 97,1%</p> <p>- Média (250,0 µg/mL) – 100,2%</p> <p>- Alta – (500 µg/mL) – 103,9%</p>
Limite de detecção	- Relação S/R > 3	0,32 µg/mL – S/R = 3	0,88 µg/mL – S/R = 3
Limite de quantificação	- Relação S/R > 10	0,95 µg/mL – S/R = 10	2,64 µg/mL – S/R = 10
Faixa	Intervalo que apresenta linearidade, precisão e exatidão	1,00 a 120,00 µg/mL ou 0,01 a 1,20% do analito na amostra	5,00 a 500,00 µg/mL ou 0,05 a 5,00% do analito na amostra

LEGENDA: t_{calc} – valor de t calculado; t_{crit} – valor de t tabelado para a estatística do teste; F_{calc} – valor de F calculado para a estatística do teste; F_{crit} – valor de F tabelado para $n = 13$, fator = 1 e $\alpha = 0,05$.

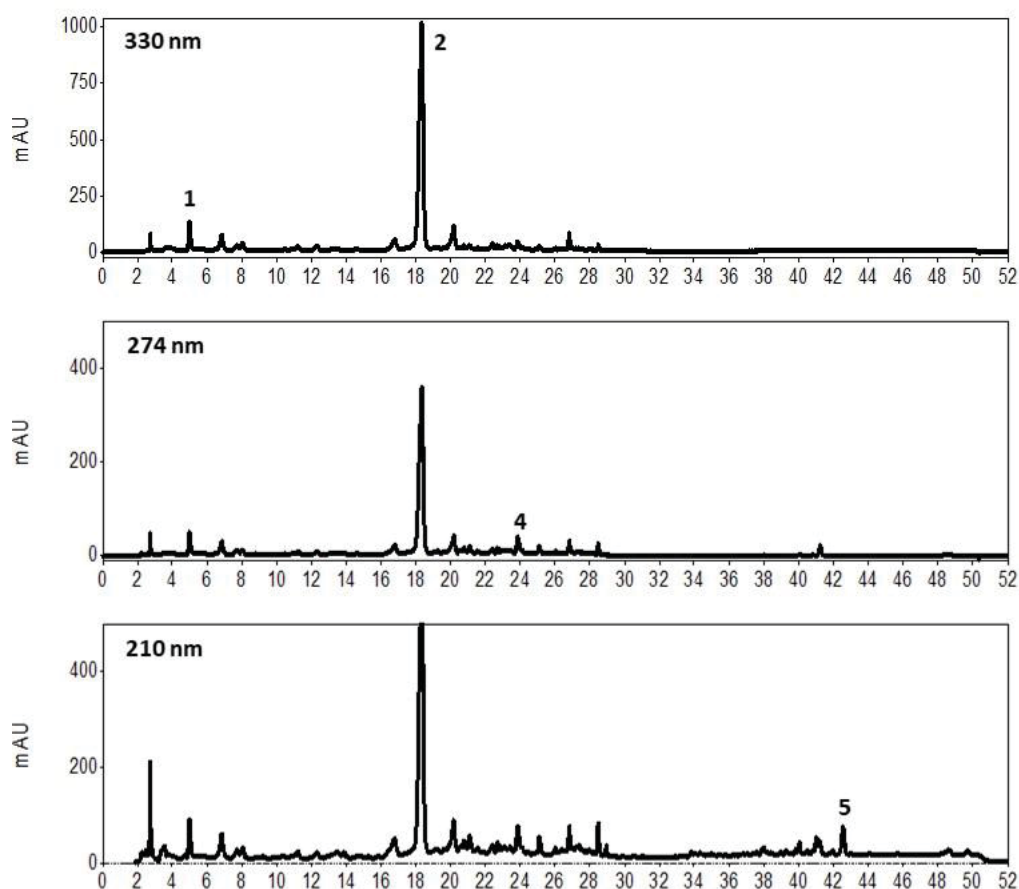
5.1.2 Resultados de teor dos metabólitos secundários nas amostras de guaco

Todas as amostras de guaco utilizadas na pesquisa foram analisadas por CLAE-DAD conforme método validado. Na FIGURA 8 e FIGURA 9 são apresentados os perfis cromatográficos obtidos para uma amostra da espécie *M. laevigata* e *M. glomerata* respectivamente. Os perfis apresentados nas figuras foram obtidos de amostras adquiridas junto ao CPQBA, possuindo, portanto, identificação botânica. Cada grupo de moléculas de interesse é apresentado no seu comprimento de onda ótimo, conforme descrito nos materiais e métodos, a identificação dos picos foi estabelecida por similaridade dos tempos de retenção e perfis espectrais em relação aos padrões de referência autênticos.

FIGURA 8 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DE UMA AMOSTRA DE *M. laevigata*



LEGENDA: 1 – ácido clorogênico; 2 – ácido 3,5 dicafeoilquínico; 3 – ácido o-cumárico; 4 – cumarina; 5 – ácido caurenóico.

FIGURA 9 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DE UMA AMOSTRA DE *M. glomerata*

LEGENDA: 1 – ácido clorogênico; 2 – ácido 3,5 dicafeoilquínico; 4 – cumarina; 5 – ácido caurenóico.

A comparação dos dois perfis cromatográficos permite confirmar o já reportado por outros pesquisadores em trabalhos anteriores (ALMEIDA *et al.*, 2017; BERTOLUCCI *et al.*, 2009, 2013a, 2013b; BORGHI; ALMEIDA; SAWAYA, 2019; COSTA *et al.*, 2018; DE MELO; SAWAYA, 2015; UENO; SAWAYA, 2019; VIEIRA *et al.*, 2020). Em 330 nm é possível observar a maior intensidade dos picos dos derivados do ácido cafeico (ácido clorogênico e ácido 3,5 dicafeoilquínico) na espécie *M. glomerata* em relação à *M. laevigata*. Já em 274 nm são observadas maiores intensidades dos picos dos derivados do ácido cinâmico (ácido *o*-cumárico e cumarina) na espécie *M. laevigata* em comparação à *M. glomerata*. Já o ácido caurenóico não apresentou um perfil de diferenciação nítido entre as duas espécies, com as concentrações dessa molécula variando de forma aleatória entre as amostras.

O perfil descrito no parágrafo anterior foi observado para todas as amostras com identificação botânica adquiridas do CPQBA e demonstra a diferença no metabolismo secundário das espécies conhecidas como guaco. Esses resultados

ficam bastante claros na avaliação dos teores calculados para cada uma dessas moléculas nas amostras com identificação botânica (TABELA 4).

Como forma de preparação para a construção do modelo quimiométrico, as amostras de *M. glomerata* dessa tabela foram reunidas em um grupo denominado GI, bem como as amostras de *M. laevigata* foram reunidas em um grupo denominado LI.

Optou-se por se realizar misturas binárias das amostras de *M. glomerata* para obtenção de novas amostras, uma vez que apenas seis amostras dessa espécie foram obtidas junto ao CPQBA, enquanto 18 amostras da outra espécie foram conseguidas do mesmo local. Essa abordagem procurou equilibrar o número de amostras das duas espécies no modelo quimiométrico, favorecendo que a estatística aplicada não fosse prejudicada pelo menor número de leituras de uma espécie em detrimento da outra. Essas misturas estão apresentadas na coluna de códigos pela representação da soma de dois códigos diferentes.

Na mesma tabela são apresentados os teores obtidos para as amostras de outras espécies vegetais utilizadas para desafiar o modelo quimiométrico com relação à distinção de amostras que não pertencem às espécies de interesse do trabalho. As espécies selecionadas para desafiar o modelo são todas plantas medicinais utilizadas pela população brasileira, além disso as partes utilizadas são as folhas assim como o guaco, sendo uma delas, *M. hirsutissima*, pertencente ao mesmo gênero das espécies de guaco.

Avaliando os resultados das outras espécies vegetais apresentadas na tabela, apenas a espécie pertencente ao gênero *Mikania* apresentou um perfil semelhante em relação às espécies de guaco para os metabólitos secundários monitorados no trabalho. Já as outras quatro espécies apresentaram perfis para esses metabólitos muito diferentes em relação ao guaco, com a ausência de todas as moléculas analisadas na espécie *M. ilicifolia*. Essa característica definiu esse grupo como heterogêneo em relação ao perfil dessas moléculas, tendo sido, portanto, um grupo de amostras interessante para desafiar a capacidade de diferenciação das espécies nos modelos quimiométricos construídos com os espectros no infravermelho do pó das folhas das amostras.

TABELA 4 – RESULTADOS DE TEOR DOS METABÓLITOS SEGUNDÁRIOS NAS AMOSTRAS COM IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E OUTRAS ESPÉCIES (continua)

CÓDIGO	ESPÉCIE	GRUPO	AC (%)*	AD (%)*	OC (%)*	CU (%)*	CA (%)*
DBS96	<i>M. glomerata</i>	GI	0,4357 ± 0,0080	3,0176 ± 0,0569	0,0000 ± 0,0000	0,0577 ± 0,0080	0,6618 ± 0,0109
DBS96 + DBS98	<i>M. glomerata</i>	GI	0,4846 ± 0,0098	3,9848 ± 0,0642	0,0000 ± 0,0000	0,0815 ± 0,0080	0,5525 ± 0,0086
DBS96 + RBN50	<i>M. glomerata</i>	GI	0,4390 ± 0,0079	3,6907 ± 0,0645	0,0000 ± 0,0000	0,0291 ± 0,0038	0,3319 ± 0,0056
DBS96 + RFV2456	<i>M. glomerata</i>	GI	0,2910 ± 0,0053	2,6563 ± 0,0467	0,0000 ± 0,0000	0,0697 ± 0,0055	0,4496 ± 0,0070
DBS98	<i>M. glomerata</i>	GI	0,5336 ± 0,0186	4,9521 ± 0,1003	0,0000 ± 0,0000	0,1053 ± 0,0081	0,4432 ± 0,0075
DBS98 + RFV2532	<i>M. glomerata</i>	GI	0,6367 ± 0,0106	3,4823 ± 0,0592	0,0000 ± 0,0000	0,0639 ± 0,0046	0,5779 ± 0,0090
RBN50	<i>M. glomerata</i>	GI	0,4424 ± 0,0079	4,3637 ± 0,0729	0,0000 ± 0,0000	0,0006 ± 0,0004	0,0020 ± 0,0006
RBN50 + DBS98	<i>M. glomerata</i>	GI	0,4880 ± 0,0100	4,6579 ± 0,0750	0,0000 ± 0,0000	0,0529 ± 0,0039	0,2226 ± 0,0037
RBN50 + RFV2448	<i>M. glomerata</i>	GI	0,7236 ± 0,0114	3,1940 ± 0,0511	0,0000 ± 0,0000	0,0306 ± 0,0157	0,0027 ± 0,0001
RFV2448	<i>M. glomerata</i>	GI	1,0048 ± 0,0157	2,0244 ± 0,0318	0,0000 ± 0,0000	0,0607 ± 0,0310	0,0035 ± 0,0004
RFV2456	<i>M. glomerata</i>	GI	0,1462 ± 0,0026	2,2950 ± 0,0375	0,0000 ± 0,0000	0,0816 ± 0,0031	0,2375 ± 0,0043
RFV2456 + DBS98	<i>M. glomerata</i>	GI	0,3399 ± 0,0093	3,6235 ± 0,0623	0,0000 ± 0,0000	0,0935 ± 0,0056	0,3403 ± 0,0059
RFV2456 + RFV2448	<i>M. glomerata</i>	GI	0,5755 ± 0,0090	2,1597 ± 0,0339	0,0000 ± 0,0000	0,0712 ± 0,0141	0,1205 ± 0,0023
RFV2532	<i>M. glomerata</i>	GI	0,7398 ± 0,0148	2,0126 ± 0,0355	0,0000 ± 0,0000	0,0226 ± 0,0011	0,7126 ± 0,0112
RFV2532 + DBS96	<i>M. glomerata</i>	GI	0,5878 ± 0,0114	2,5151 ± 0,0461	0,0000 ± 0,0000	0,0401 ± 0,0045	0,6872 ± 0,0110
RFV2532 + RBN50	<i>M. glomerata</i>	GI	0,5911 ± 0,0113	3,1882 ± 0,0541	0,0000 ± 0,0000	0,0116 ± 0,0003	0,3573 ± 0,0057
RFV2532 + RFV2448	<i>M. glomerata</i>	GI	0,8723 ± 0,0144	2,0185 ± 0,0321	0,0000 ± 0,0000	0,0416 ± 0,0150	0,3580 ± 0,0056
RFV2532 + RFV2456	<i>M. glomerata</i>	GI	0,4430 ± 0,0087	2,1538 ± 0,0364	0,0000 ± 0,0000	0,0521 ± 0,0021	0,4750 ± 0,0074
DBS119	<i>M. laevigata</i>	LI	0,0382 ± 0,0008	0,1111 ± 0,0020	0,2427 ± 0,0045	0,4822 ± 0,0126	1,0886 ± 0,0182
DBS80	<i>M. laevigata</i>	LI	0,5163 ± 0,0152	0,7307 ± 0,0205	0,1281 ± 0,0040	0,6332 ± 0,0099	0,1773 ± 0,0056
DBS97	<i>M. laevigata</i>	LI	0,6013 ± 0,0094	0,2917 ± 0,0046	0,0999 ± 0,0016	0,5414 ± 0,0099	0,2212 ± 0,0035
DBS99	<i>M. laevigata</i>	LI	0,4461 ± 0,0070	0,5437 ± 0,0090	0,0866 ± 0,0019	0,7648 ± 0,0198	0,1188 ± 0,0025
RBN35	<i>M. laevigata</i>	LI	0,0497 ± 0,0012	0,1206 ± 0,0022	0,1801 ± 0,0029	0,4018 ± 0,0071	0,9958 ± 0,0157
RBN48	<i>M. laevigata</i>	LI	0,5560 ± 0,0104	0,6080 ± 0,0112	0,0981 ± 0,0015	0,4710 ± 0,0080	0,1647 ± 0,0028
RBN58	<i>M. laevigata</i>	LI	0,6093 ± 0,0148	0,8217 ± 0,0164	0,1060 ± 0,0035	0,4306 ± 0,0074	0,1537 ± 0,0025
RFV2400	<i>M. laevigata</i>	LI	0,3412 ± 0,0055	0,5253 ± 0,0083	0,1250 ± 0,0022	0,5984 ± 0,0093	0,5642 ± 0,0088

TABELA 4 – RESULTADOS DE TEOR DOS METABÓLITOS SEGUNDÁRIOS NAS AMOSTRAS COM IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E OUTRAS ESPÉCIES (conclusão)

CÓDIGO	ESPÉCIE	GRUPO	AC (%)*	AD (%)*	OC (%)*	CU (%)*	CA (%)*
RFV2429	<i>M. laevigata</i>	LI	0,3926 ± 0,0062	0,6498 ± 0,0122	0,1237 ± 0,0022	0,6453 ± 0,0101	0,3034 ± 0,0047
RFV2440	<i>M. laevigata</i>	LI	0,3451 ± 0,0054	0,5805 ± 0,0095	0,1021 ± 0,0019	0,6224 ± 0,0097	0,2254 ± 0,0035
RFV2457	<i>M. laevigata</i>	LI	0,0604 ± 0,0012	0,1550 ± 0,0025	0,1536 ± 0,0025	0,5478 ± 0,0088	0,9325 ± 0,0147
RFV2458	<i>M. laevigata</i>	LI	0,2412 ± 0,0066	0,4605 ± 0,0112	0,1326 ± 0,0025	0,6907 ± 0,0108	0,1278 ± 0,0021
RFV2498	<i>M. laevigata</i>	LI	0,2317 ± 0,0044	0,4482 ± 0,0128	0,1218 ± 0,0023	0,7389 ± 0,0119	0,1460 ± 0,0023
RFV2499	<i>M. laevigata</i>	LI	0,2194 ± 0,0106	0,3920 ± 0,0163	0,1777 ± 0,0030	0,3772 ± 0,0083	1,2264 ± 0,0191
RFV2501	<i>M. laevigata</i>	LI	0,1089 ± 0,0020	0,2214 ± 0,0035	0,1844 ± 0,0031	0,7689 ± 0,0127	0,1525 ± 0,0026
RFV2502	<i>M. laevigata</i>	LI	0,4890 ± 0,0097	0,9238 ± 0,0179	0,0859 ± 0,0014	0,5040 ± 0,0081	0,3019 ± 0,0048
RFV2531	<i>M. laevigata</i>	LI	0,0846 ± 0,0014	0,1907 ± 0,0030	0,1569 ± 0,0025	0,3936 ± 0,0066	1,1869 ± 0,0185
RFV924	<i>M. laevigata</i>	LI	0,1709 ± 0,0029	0,5079 ± 0,0093	0,2046 ± 0,0033	0,4149 ± 0,0065	1,0137 ± 0,0158
50	<i>M. sylvestris</i>	O	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0209 ± 0,0026	0,0000 ± 0,0000
51	<i>C. sinensis</i>	O	0,2334 ± 0,0039	1,1023 ± 0,0221	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000
52	<i>A. muricata</i>	O	0,2015 ± 0,0035	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0088 ± 0,0089	0,0000 ± 0,0000
53	<i>M. ilicifolia</i>	O	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000
54	<i>M. hirsutissima</i>	O	0,0722 ± 0,0040	1,2117 ± 0,0215	0,0041 ± 0,0001	0,1080 ± 0,0066	0,0504 ± 0,0024

NOTA: * Médias das triplicatas ± desvio padrão.

LEGENDA: LI – *M. laevigata* com identificação botânica; GI – *M. glomerata* com identificação botânica; O – outras espécies; AC – ácido clorogênico; AD – ácido 3,5 dicafeoilquinico; OC – ácido o-cumárico; CU – cumarina; CA – ácido caurenóico.

Para fins de classificação das espécies das amostras não identificadas de guaco coletadas em campo ou adquiridas no comércio, os resultados das análises do grupo GI e LI para cumarina e ácido clorogênico foram utilizados conforme descrito no item 4.4.3. Essa abordagem foi utilizada considerando quatro trabalhos recentes que empregaram modelos quimiométricos com padrões de diferenciação das espécies. Em todos esses trabalhos foram utilizados os resultados de análises cromatográficas para construção dos modelos, com a consequente conclusão sobre as moléculas que melhor identificavam *M. glomerata* e *M. laevigata*.

Almeida e colaboradores (2017) descrevem um modelo quimiométrico para o qual a principal contribuição para um padrão de distribuição das amostras das duas espécies foram cumarina, ácido clorogênico e ácido 3,5 dicafeoilquínico, sendo que a primeira estava presente em maior quantidade em *M. laevigata*, enquanto os outros dois em maior quantidade em *M. glomerata*.

Já o trabalho de Costa e colaboradores (2018) apresentou um modelo quimiométrico em que os principais marcadores responsáveis pelo padrão de distribuição das amostras das folhas das duas espécies nas componentes principais foram, além das três citadas anteriormente, também a molécula de melilotosídeo. De igual forma, a presença das moléculas em cada espécie foi a mesma reportada pelo estudo anterior, com o melilotosídeo também presente em maior quantidade na *M. laevigata*.

O trabalho de Ueno e Sawaya (2019) analisou compostos voláteis nas folhas de guaco e o modelo de distribuição das amostras nas componentes principais foi fortemente influenciado pela cumarina, além de outras moléculas voláteis analisadas, mas não monitoradas neste trabalho.

Finalmente, Vieira e colaboradores (2020) apresentam um modelo quimiométrico que possui o seu perfil de distribuição significativamente orientado pela cumarina com a mesma presença dessa molécula nas espécies conforme reportado nos estudos anteriores.

Considerando esses quatro estudos que demonstram em todos eles a cumarina como molécula alvo para diferenciação das espécies, essa foi a molécula de referência utilizada na orientação das amostras sem identificação botânica, com o auxílio do ácido clorogênico descrito nos dois primeiros estudos citados para também auxiliar nessa classificação. Os resultados obtidos para os teores dos analitos de interesse nas amostras não identificadas estão reportados na TABELA 5.

TABELA 5 – RESULTADOS DE TEOR DAS AMOSTRAS ADQUIRIDAS NO COMÉRCIO

CÓDIGO	ORIGEM	ESPÉCIE	GRUPO	AC (%)*	AD (%)*	OC (%)*	CU (%)*	CA (%)*
1	Colombo-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0786 ± 0,0032	0,1188 ± 0,0019	0,0421 ± 0,0347	0,3891 ± 0,0109 ^a	0,7828 ± 0,0139
2	Curitiba-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0841 ± 0,0013	0,2150 ± 0,0034	0,0967 ± 0,0053	0,2942 ± 0,0083 ^a	0,2842 ± 0,0051
3	São Paulo-SP	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0540 ± 0,0009	0,0631 ± 0,0014	0,0831 ± 0,0013	0,3379 ± 0,0053 ^a	1,0425 ± 0,0167
4	Curitiba-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0495 ± 0,0009	0,1085 ± 0,0020	0,0828 ± 0,0013	0,3825 ± 0,0062 ^a	0,7659 ± 0,0420
5	Colombo-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0364 ± 0,0017	0,0554 ± 0,0010	0,0520 ± 0,0434	0,3476 ± 0,0081 ^a	1,3367 ± 0,0214
6	Curitiba-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0204 ± 0,0004	0,0536 ± 0,0020	0,0597 ± 0,0018	0,2502 ± 0,0083 ^a	0,7935 ± 0,1532
7	Curitiba-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0614 ± 0,0010	0,0992 ± 0,0017	0,0663 ± 0,0012	0,3254 ± 0,0061 ^a	0,0034 ± 0,0004
8	Curitiba-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,1248 ± 0,0037	0,1202 ± 0,0031	0,0557 ± 0,0009	0,3127 ± 0,0065 ^a	0,0035 ± 0,0004
9	Pato Bragado-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0126 ± 0,0008	0,0217 ± 0,0174	0,0843 ± 0,0020	0,6287 ± 0,0110 ^a	0,0034 ± 0,0004
10	Toledo-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0211 ± 0,0007	0,0709 ± 0,0020	0,1183 ± 0,0023	0,6622 ± 0,0137 ^a	0,0034 ± 0,0004
11	Botucatu-SP	<i>M. glomerata</i>	GNI	0,0728 ± 0,0036 ^a	0,5144 ± 0,0125	0,0136 ± 0,0003	0,0435 ± 0,0007 ^{b,c}	0,1288 ± 0,0033
12	Botucatu-SP	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0185 ± 0,0004	0,0563 ± 0,0010	0,0685 ± 0,0013	0,5039 ± 0,0081 ^a	0,1045 ± 0,0070
13	Curitiba-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0256 ± 0,0010	0,0481 ± 0,0012	0,0952 ± 0,0015	0,3297 ± 0,0052 ^a	0,1368 ± 0,0022
14	Maringá-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0489 ± 0,0016	0,0855 ± 0,0027	0,0666 ± 0,0010	0,2222 ± 0,0052 ^a	0,1394 ± 0,0024
15	Maringá-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0714 ± 0,0028	0,0781 ± 0,0020	0,0585 ± 0,0009	0,3625 ± 0,0099 ^a	0,1844 ± 0,0076
16	Cascavel-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0665 ± 0,0015	0,0974 ± 0,0025	0,0751 ± 0,0012	0,3665 ± 0,0061 ^a	0,1153 ± 0,0019
17	Maringá-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0326 ± 0,0006	0,2658 ± 0,0068	0,0587 ± 0,0010	0,3921 ± 0,0108 ^a	0,2507 ± 0,0117
18	Maringá-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0033 ± 0,0001	0,0286 ± 0,0008	0,0397 ± 0,0015	0,1975 ± 0,0058 ^a	0,1622 ± 0,0026
19	Araraquara-SP	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0366 ± 0,0021	0,0377 ± 0,0013	0,0453 ± 0,0008	0,4935 ± 0,0109 ^a	0,0080 ± 0,0002
20	Lucas do Rio Verde-MT	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0588 ± 0,0011	0,0793 ± 0,0014	0,0786 ± 0,0022	0,4390 ± 0,0069 ^a	0,0413 ± 0,0013
21	Sinop-MT	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0790 ± 0,0013	0,1248 ± 0,0033	0,0403 ± 0,0007	0,4050 ± 0,0073 ^a	0,4345 ± 0,0157
22	Lages-SC	<i>M. glomerata</i>	GNI	0,0039 ± 0,0003 ^a	0,0494 ± 0,0034	0,0259 ± 0,0006	0,0386 ± 0,0055 ^{b,c}	0,1035 ± 0,0018
23	Curitiba-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0028 ± 0,0001	0,0000 ± 0,0000	0,3532 ± 0,0059	0,6354 ± 0,0133 ^a	0,1323 ± 0,0022
24	Curitiba-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0014 ± 0,0003	0,0000 ± 0,0000	1,9487 ± 0,0383	0,3913 ± 0,0147 ^a	0,1260 ± 0,0037
25	Curitiba-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,1685 ± 0,0046	0,4114 ± 0,0088 ^a	0,1413 ± 0,0022
26	Curitiba-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0102 ± 0,0006	0,0439 ± 0,0024	0,1654 ± 0,0035	0,4088 ± 0,0110 ^a	0,0136 ± 0,0009
27	Curitiba-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0021 ± 0,0001	0,0155 ± 0,0008	0,0605 ± 0,0012	0,2359 ± 0,0076 ^a	0,0473 ± 0,0013

(continua)

FIGURA 5 – RESULTADOS DE TEOR DAS AMOSTRAS ADQUIRIDAS NO COMÉRCIO

CÓDIGO	ORIGEM	ESPÉCIE	GRUPO	AC (%)*	AD (%)*	OC (%)*	CU (%)*	CA (%)*	(conclusão)
28	Araraquara-SP	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0061 ± 0,0003	0,0076 ± 0,0007	0,0251 ± 0,0006	0,2117 ± 0,0033 ^a	0,3713 ± 0,0060	
29	Botucatu-SP	<i>M. glomerata</i>	GNI	0,0347 ± 0,0006 ^a	0,1348 ± 0,0044	0,0046 ± 0,0001	0,0572 ± 0,0017 ^{b,c}	0,1418 ± 0,0023	
30	Botucatu-SP	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0063 ± 0,0008	0,0171 ± 0,0021	0,0679 ± 0,0011	0,2079 ± 0,0035 ^a	0,1704 ± 0,0058	
31	Cascavel-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0177 ± 0,0008	0,0307 ± 0,0015	0,0587 ± 0,0015	0,2098 ± 0,0035 ^a	0,6204 ± 0,0115	
32	Campo Grande-MS	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0639 ± 0,0039	0,0899 ± 0,0059	0,0782 ± 0,0012	0,2937 ± 0,0051 ^a	1,4970 ± 0,0504	
33	Floresta-PR	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0236 ± 0,0008	0,0355 ± 0,0007	0,0737 ± 0,0011	0,2206 ± 0,0037 ^a	0,5483 ± 0,0094	
34	Campinas-SP	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0774 ± 0,0044	0,1170 ± 0,0050	0,0415 ± 0,0347	0,3832 ± 0,0187 ^a	0,1864 ± 0,0032	
35	Campinas-SP	<i>M. glomerata</i>	GNI	0,0713 ± 0,0052 ^a	0,5033 ± 0,0289	0,0133 ± 0,0008	0,0426 ± 0,0023 ^{b,c}	0,2404 ± 0,0051	
36	Campinas-SP	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0182 ± 0,0008	0,0554 ± 0,0024	0,0674 ± 0,0030	0,4962 ± 0,0210 ^a	0,8106 ± 0,0132	
37	Campinas-SP	<i>M. glomerata</i>	GNI	0,0335 ± 0,0007 ^a	0,0915 ± 0,0021	0,0030 ± 0,0001	0,0512 ± 0,0024 ^{b,c}	0,5097 ± 0,0087	
38	Campinas-SP	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0068 ± 0,0010	0,0173 ± 0,0009	0,0870 ± 0,0014	0,2339 ± 0,0037 ^a	0,0658 ± 0,0024	
39	Campinas-SP	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0125 ± 0,0010	0,0213 ± 0,0174	0,0830 ± 0,0038	0,6192 ± 0,0268 ^a	0,0877 ± 0,0018	
40	Campinas-SP	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0032 ± 0,0002	0,0037 ± 0,0002	0,0820 ± 0,0013	0,2322 ± 0,0043 ^a	0,0970 ± 0,0036	
41	Campinas-SP	<i>M. glomerata</i>	GNI	0,3277 ± 0,1074 ^b	2,2389 ± 0,7774	0,0007 ± 0,0007	0,0595 ± 0,0057 ^b	0,1268 ± 0,0060	
42	Campinas-SP	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0489 ± 0,0023	0,1188 ± 0,0052	0,1774 ± 0,0076	0,3957 ± 0,0172 ^a	0,4279 ± 0,0230	
43	Campinas-SP	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0476 ± 0,0044	0,1156 ± 0,0105	0,1727 ± 0,0157	0,3853 ± 0,0350 ^a	0,6940 ± 0,0135	
44	Campinas-SP	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0482 ± 0,0034	0,1172 ± 0,0079	0,1750 ± 0,0117	0,3904 ± 0,0262 ^a	0,0079 ± 0,0003	
45	Campinas-SP	<i>M. laevigata</i>	LNI	0,0493 ± 0,0017	0,1197 ± 0,0035	0,1789 ± 0,0051	0,3990 ± 0,0117 ^a	0,1566 ± 0,0026	
46	Campinas-SP	<i>M. glomerata</i>	GNI	0,9831 ± 0,0532 ^a	1,9807 ± 0,1073	0,0000 ± 0,0000	0,0594 ± 0,0311 ^{b,c}	0,9807 ± 0,0418	
47	Campinas-SP	<i>M. glomerata</i>	GNI	0,9977 ± 0,0279 ^a	2,0102 ± 0,0563	0,0000 ± 0,0000	0,0603 ± 0,0310 ^{b,c}	0,9549 ± 0,0864	
48	Campinas-SP	<i>M. glomerata</i>	GNI	0,9763 ± 0,0650 ^a	1,9670 ± 0,1311	0,0000 ± 0,0000	0,0590 ± 0,0312 ^{b,c}	0,9676 ± 0,0645	
49	Campinas-SP	<i>M. glomerata</i>	GNI	0,9902 ± 0,0408 ^a	1,9951 ± 0,0824	0,0000 ± 0,0000	0,0598 ± 0,0311 ^{b,c}	0,9888 ± 0,0277	

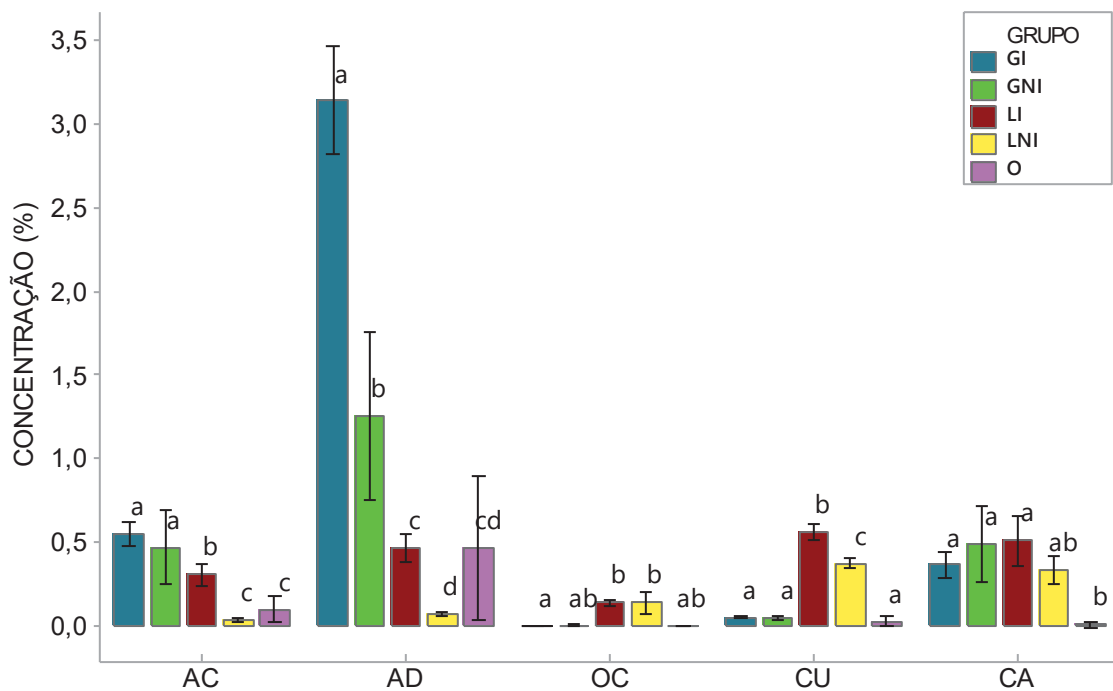
NOTA: * Médias das triplicatas ± desvio padrão; ^a p < 0,05 em relação a classe *M. glomerata* com identificação botânica – GI; ^b p > 0,05 em relação a classe *M. glomerata* com identificação botânica GI; ^c p < 0,05 em relação a classe *M. laevigata* com identificação botânica – LI.

LEGENDA: LNI – *M. laevigata* não identificada; GNI – *M. glomerata* não identificada; AC – ácido clorogênico; AD – ácido 3,5 dicafeoilquinico; OC – ácido o-cumárico; CU – cumarina; CA – ácido caurenóico.

Embora todas as amostras da tabela anterior tenham sido adquiridas com a denominação de *M. glomerata*, apenas 10 amostras (GNI) foram classificadas como essa espécie pela comparação dos metabólitos secundários, as demais 39 amostras foram classificadas como sendo da espécie *M. laevigata* (LNI).

Esse fato pode ser atribuído a dificuldade na diferenciação entre as duas espécies de guaco conforme apresentado na revisão da literatura. Na FIGURA 10 é apresentado gráfico com a comparação dos teores dos metabólitos secundários entre os grupos formados.

FIGURA 10 – COMPARAÇÃO DOS TEORES DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ENTRE OS GRUPOS FORMADOS



NOTA: Médias de cada metabólito que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes através do teste de Tukey com 95% de confiança.

LEGENDA: LI – *M. laevigata* com identificação botânica; GI – *M. glomerata* com identificação botânica; O – outras espécies; LNI – *M. laevigata* não identificada; GNI – *M. glomerata* não identificada; AC – ácido clorogênico; AD – ácido 3,5 dicafeoilquínico; OC – ácido o-cumárico; CU – cumarina; CA – ácido caurenóico.

Os grupos constituídos demonstram uma clara presença mais abundante dos derivados do ácido cafeico nas amostras de *M. glomerata* em relação às amostras de *M. laevigata*, ocorrendo o inverso em relação aos derivados do ácido cinâmico. Nesse último grupo fitoquímico está a diferença mais significativa entre as duas espécies, uma vez que para a cumarina ocorreu similaridade nas concentrações entre GI / GNI

e LI / LNI. Esses resultados permitem questionar os critérios oficiais atuais utilizados no controle de qualidade e padronização química da espécie *M. glomerata*, uma vez que a cumarina não é uma molécula com relevância na composição química da espécie.

Para o outro grupamento fitoquímico utilizado para a diferenciação das espécies de guaco, derivados do ácido cafeico, a ausência de similaridade dos teores entre os grupos formados pode ser atribuída à variação observada na produção desses metabólitos em função da sazonalidade, condições de crescimento e local de cultivo conforme já reportado por outros autores (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2016; ALMEIDA *et al.*, 2017; BERTOLUCCI *et al.*, 2013a). Conforme apresentado na TABELA 5, as amostras não identificadas tiveram como procedência cinco estados brasileiros localizados nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, apresentando clima, composição do solo e incidência de luminosidade bastante diferenciados entre si.

Já o ácido caurenóico não apresentou um perfil de diferenciação entre as duas espécies, não sendo, portanto, uma molécula de interesse para diferenciação entre ambas.

Com todas as amostras devidamente direcionadas para cada grupo, foi possível seguir com o modelo da classificação quimiométrico guiado pelas classes formadas através das análises por CLAE.

5.1.3 Análise exploratória por PCA para os espectros no infravermelho

A análise por PCA procurou avaliar de forma exploratória a distribuição das amostras com diferentes pré-tratamentos. Logo, os espectros obtidos por IV-médio e IV-próximo foram submetidos aos pré-tratamentos centragem dos dados na média, normalização, autoescalamento, alisamento (Savitzky-Golay), correção multiplicativa de espalhamento (MSC), correção da linha de base (primeira e segunda derivadas) e ponderação dos mínimos quadrados generalizados (GLSW). Todos avaliados individualmente e em diferentes combinações.

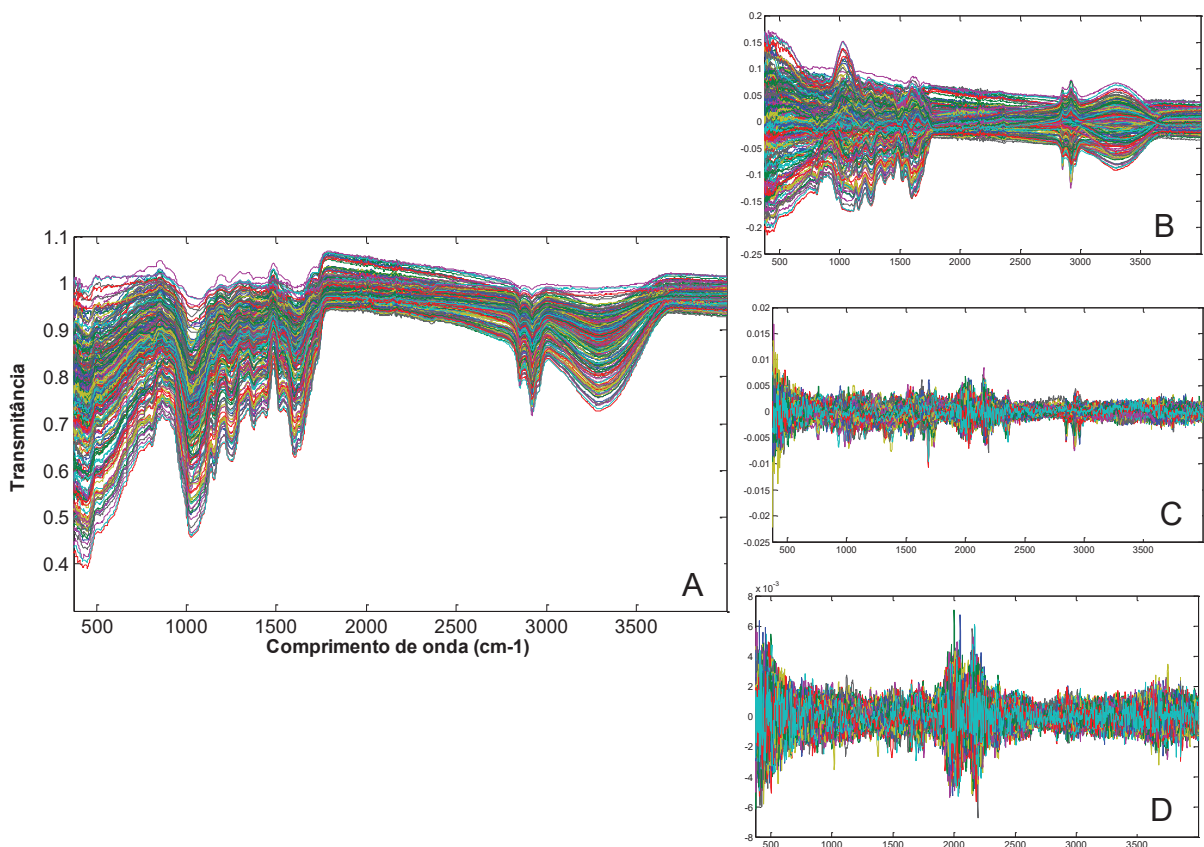
Considerando as características intrínsecas às amostras analisadas, o pré-tratamento GLSW foi o mais adequado para atenuar diferenças existentes quanto à procedência, condições de colheita e secagem do material vegetal, além de atenuar

variações existentes entre os dias de leitura dessas amostras que foram realizadas em um intervalo de dois anos. Valores entre 0,0001 e 3 foram avaliados para o filtro (α), utilizando como critérios para definição do melhor valor o reconhecimento de um padrão de distribuição das amostras pelo gráfico dos escores, a menor perda de informação em relação aos dados originais e possibilidade de avaliar relação entre as variáveis originais e os pesos atribuídos ao modelo.

Nas FIGURAS 11 e 12 são apresentados os espectros em IV-médio e IV-próximo respectivamente antes e após o pré-tratamento GLSW. Nas imagens B, C e D de cada figura é possível observar a perda de informação dos dados originais com o aumento do poder do filtro.

Como descrito, esse foi um dos critérios utilizados para definição do filtro utilizado no pré-tratamento, uma vez que é indesejável uma perda de informação acentuada em relação às variáveis originais para a construção do modelo.

FIGURA 11 – ESPECTROS IV-MÉDIO ANTES E APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM GLSW



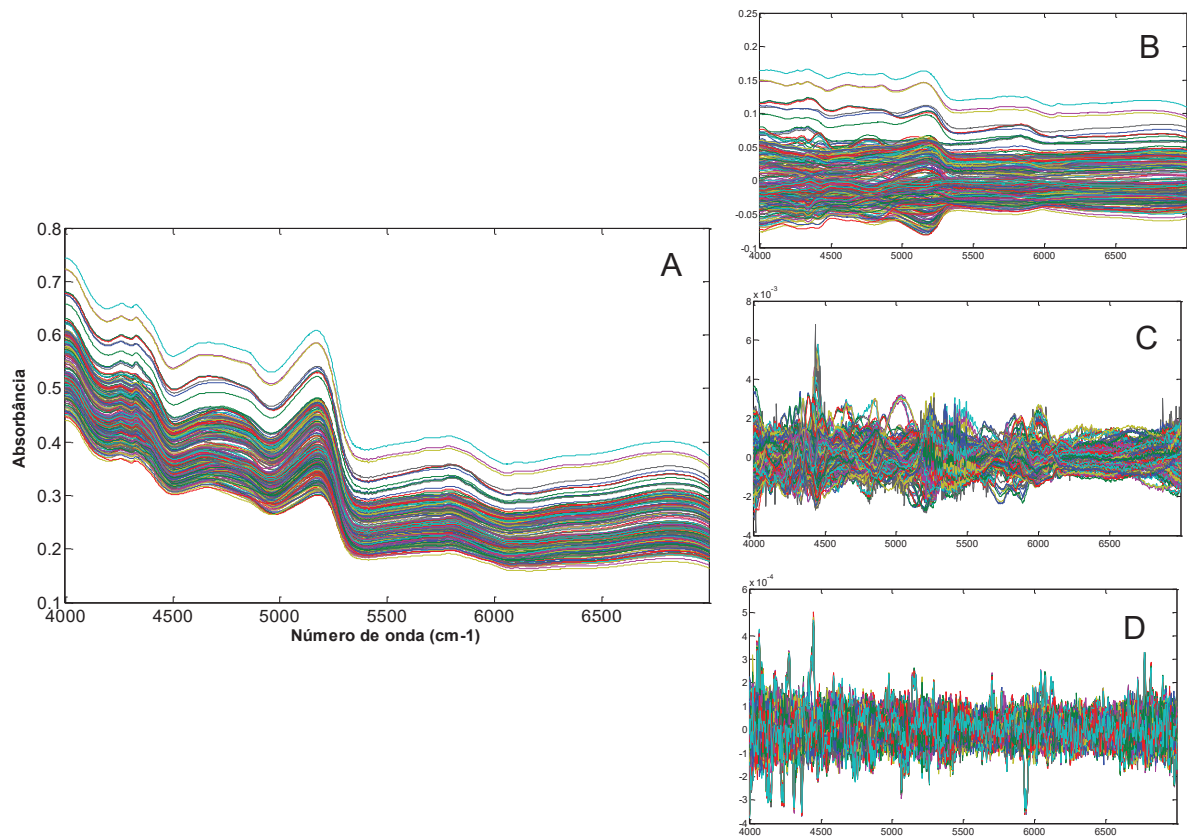
LEGENDA: A – espectros sem pré-tratamento; B – espectros com $\alpha = 3,00$; C – espectros com $\alpha = 0,01$; D – espectros com $\alpha = 0,0001$.

Embora os dados no infravermelho próximo tenham sido adquiridos entre 10.000 a 4.000 cm^{-1} , entre as regiões de 10.000 a 7.000 cm^{-1} não foi observada uma contribuição relevante do espectro para o modelo quimiométrico. Esse comportamento é explicado devido a menor complexidade dos espectros de infravermelho próximo em relação a outras regiões do infravermelho. É conhecido que espectros no IV-próximo possuem um menor número de bandas, bem como bandas mais alargadas, o que resulta em uma menor quantidade de informação espectral quando comparado, por exemplo, a espectros de infravermelho médio. Essa é uma consequência de os sinais de absorção dessa região serem sobretons ou combinações das bandas tensão vibracionais fundamentais produzidas nas regiões de IV-médio, entre 3.000 a 1.700 cm^{-1} . Isso torna os dados da técnica mais fáceis e simples de serem utilizados junto a ferramentas estatísticas, como a quimiometria, para a quantificação ou o reconhecimento de padrões. Por outro lado, os espectros no IV-médio que apresentam um maior número de bandas dentro do intervalo de aquisição, devido a essa característica, são empregados principalmente na identificação estrutural de moléculas orgânicas e bioquímicas (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2001).

Assim, conforme descrito por Ferreira (2015), variáveis que não contribuem significativamente para o modelo podem ser suprimidas, para simplificar os dados e não incluir ruídos desnecessários que possam comprometer a classificação posterior das amostras. Dessa forma, para os espectros de IV-próximo, foi utilizada faixa de 7.000 a 4.000 cm^{-1} para a análise exploratória dos dados e posterior construção do modelo de classificação das amostras por PLS-DA.

Essas características mencionadas nos dois parágrafos anteriores justificam o porquê de no presente estudo, a técnica de IV-próximo ter apresentado melhores resultados, quando comparada à técnica de IV-médio, para os modelos quimiométricos desenvolvidos de diferenciação das duas espécies de guaco.

FIGURA 12 – ESPECTROS IV-PRÓXIMO ANTES E APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM GLSW



LEGENDA: A – espectros sem pré-tratamento; B – espectros com $\alpha = 3,00$; C – espectros com $\alpha = 0,01$; D – espectros com $\alpha = 0,0001$.

Embora seja visível um deslocamento nas leituras dos espectros de todas as amostras analisadas, nenhuma leitura foi descartada tanto nos dados do IV-médio, quanto nos dados do IV-próximo. Essa medida foi tomada para permitir que os modelos contemplassem a maior variabilidade possível de dados e para avaliar se o pré-tratamento GLSW seria capaz de agrupar as amostras vencendo essas distorções.

O α definido como ótimo para ambos os casos foi de 0,01, uma vez que esta intensidade do filtro aplicado foi capaz de manter as informações dos espectros originais e conduziu a um gráfico de escores que apresentou um padrão de distribuição das amostras.

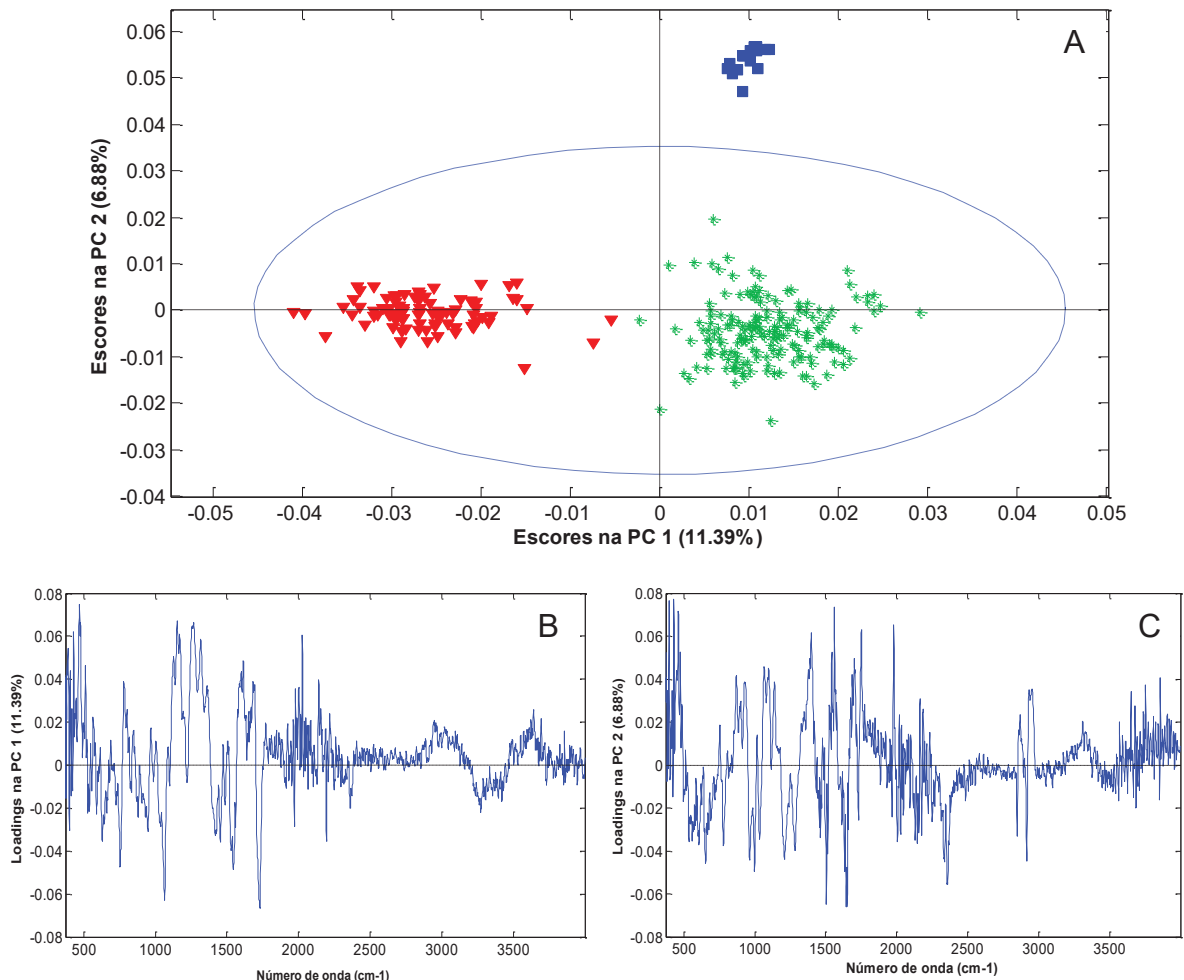
Mesmo que intensidades do filtro menores que 0,01 tenham preservado em maior quantidade as informações das variáveis originais, conforme imagens B das figuras, os valores avaliados de α ente 0,02 a 3 não foram selecionados pois não apresentaram um padrão adequado de distribuição das amostras no gráfico de escores, esse fato pode ser explicado pela incapacidade do filtro em reduzir a

variabilidade da amostra, com a manutenção do deslocamento observado nos dados originais.

Finalmente, filtros mais intensos em relação a 0,01, entre 0,009 e 0,0001, acabaram descaracterizando acentuadamente as contribuições das variáveis originais, não permitindo que as informações dos espectros no infravermelho fossem utilizadas na avaliação do modelo, portanto não foram utilizados.

A FIGURA 13 e a FIGURA 14 apresentam todas as amostras das duas espécies de guaco dentro do intervalo de confiança de 95% dos gráficos dos escores, além de estarem homoganeamente agrupadas em classes, isso eliminou a necessidade de exclusão de algum espectro por ter um comportamento de *outlier*, esta avaliação cumpriu o primeiro objetivo da análise exploratória prévia a construção de modelos de classificação, detectar a presença de *outliers*.

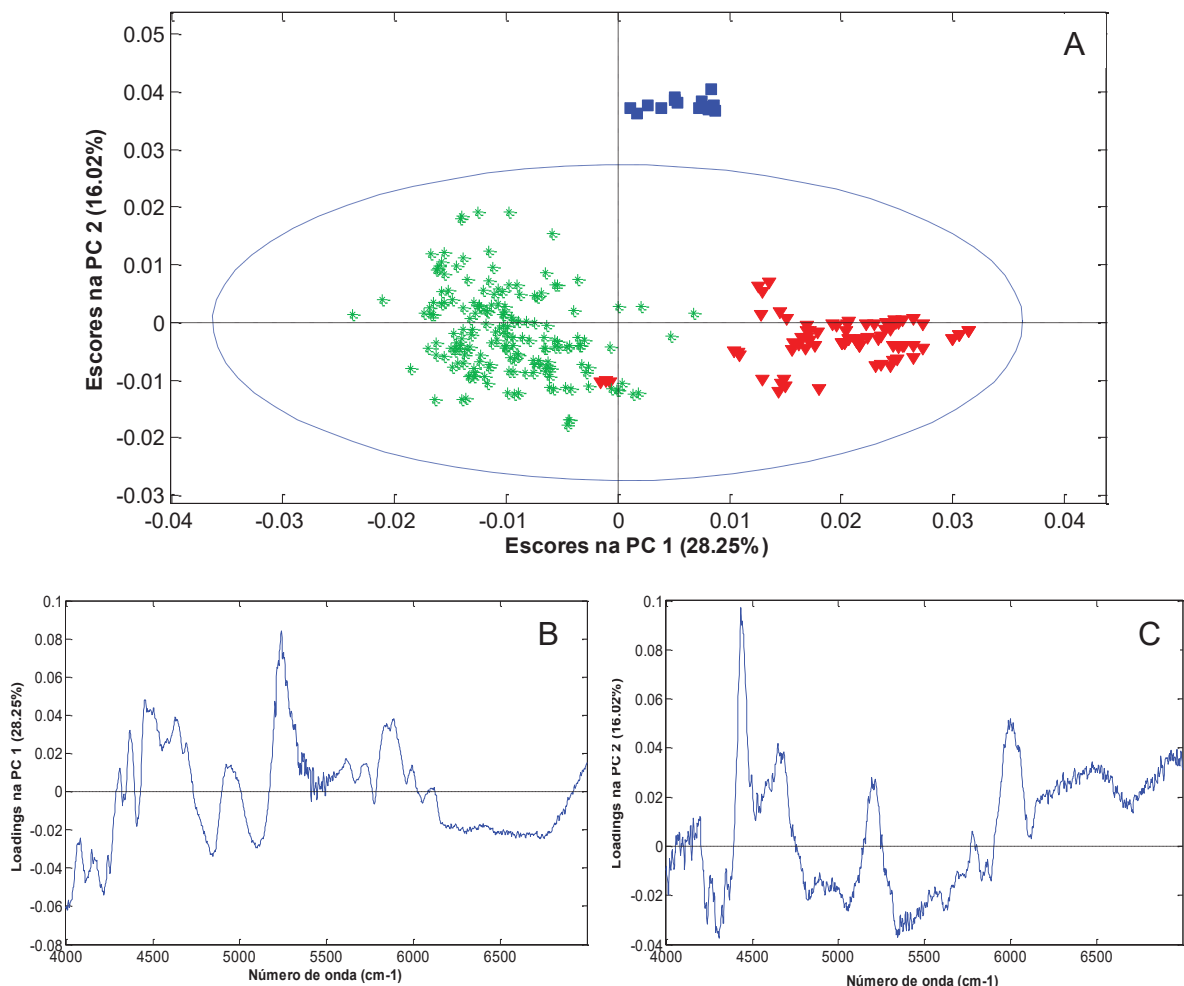
FIGURA 13 – ANÁLISE EXPLORATÓRIA POR PCA PARA OS DADOS DE IV-MÉDIO



NOTA: Linha pontilhada azul representa o intervalo de confiança de 95% para as amostras.
 LEGENDA: * *M. laevigata*; ▼ *M. glomerata*; ■ Outras espécies; A – gráfico de escores PC 1 Vs PC 2;
 B – loadings para PC 1; C – loadings para PC 2.

Também é possível através do gráfico de escores identificar um padrão de distribuição para as três classes utilizadas no modelo, *M. glomerata*; *M. laevigata* e outras espécies, sendo que das três apenas a terceira foi alocada fora do intervalo de confiança do modelo. Esse é um excelente indicativo da robustez dos modelos, uma vez que essas amostras foram utilizadas justamente no intuito de desafiar posteriormente o modelo de classificação para discriminar espécies vegetais que não pertençam as duas espécies de guaco. Essa avaliação atendeu ao segundo objetivo da análise PCA prévia ao modelo PLS-DA que é o reconhecimento de padrões na distribuição das amostras.

FIGURA 14 – ANÁLISE EXPLORATÓRIA POR PCA PARA OS DADOS DE IV-PRÓXIMO



NOTA: Linha pontilhada azul representa o intervalo de confiança de 95% para as amostras.
 LEGENDA: * *M. laevigata*; ▼ *M. glomerata*; ■ Outras espécies; A – gráfico de escores PC 1 Vs PC 2;
 B – loadings para PC 1; C – loadings para PC 2.

Finalmente, os gráficos de loadings permitem confirmar a relação existente entre as variáveis, transmitâncias lidas nos diferentes números de onda do IV-médio

e absorbâncias lidas nos diferentes números de onda do IV-próximo, e os pesos de cada uma delas na formação dos seus respectivos modelos, atendendo ao terceiro objetivo da análise exploratória dos dados. Esta última confirmação atesta que o filtro aplicado pelo pré-tratamento manteve a relevância das informações originais das variáveis sendo, portanto, adequado para a utilização na construção dos modelos de classificação PLS-DA para as duas técnicas de espectroscopia na região do infravermelho.

5.1.4 Modelo PLS-DA para identificação das espécies de guaco por IV-médio

Inicialmente o conjunto de amostras utilizadas para a calibração do modelo foi avaliado quanto ao número de variáveis latentes a serem utilizadas para melhor ajuste do modelo bem como a presença de amostras anômalas.

A definição do número de VLs é importante considerando que a projeção dos dados originais para outro plano para formação da VL conduz a uma compressão desses mesmos dados com efeitos positivos como eliminação parcial do ruído da matriz e redução da complexidade dos dados, por outro lado os dados se tornam tendenciosos. Logo, é necessário um balanço adequado entre a variância e a tendência adicionadas pelas VLs para que não ocorra subajuste ou superajuste com consequente erros na capacidade de previsão do modelo.

Para ajuste do número ótimo de variáveis latentes foi utilizado o valor da raiz da média quadrática de validação cruzada (RMSECV), a partir do método *venetian blinds* com 5 grupos.

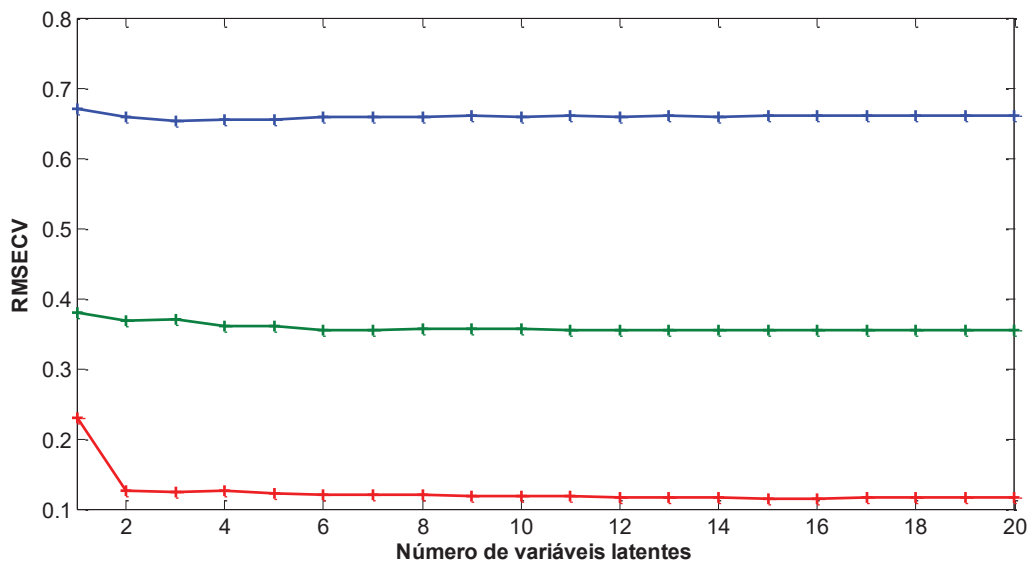
A prática comum para realizar a validação interna pelo método *leave one out*, que consiste na seleção de um número de grupos de validação interna igual ao número de amostras – uma amostra de cada vez é incluída no conjunto de validação, não foi utilizada neste trabalho porque esse método geralmente superestima o poder preditivo de um modelo e, portanto, não retorna um número confiável de variáveis latentes (BALLABIO; CONSONNI, 2013).

O modelo de validação interna utilizado consistiu em remover grupos de amostras do conjunto de calibração, um de cada vez. A cada vez, o modelo foi calibrado nas amostras de treinamento restantes e depois usado para prever amostras

do grupo de validação cruzada. Para definir o tamanho dos grupos de validação interna por *venetian blinds*, duas validações cruzadas foram realizadas nos modelos de calibração PLS-DA, com 10 e 5 grupos de validação interna. É prática comum comparar diferentes estimativas da capacidade preditiva do modelo, que são obtidas usando um número decrescente de grupos de validação interna, o que significa condições de validação mais fortes, desta forma, melhores resultados foram encontrados com 5 grupos que, conseqüentemente, foram definidos para o modelo.

Conforme FIGURA 15, para cada classe avaliada no modelo, a partir da segunda VL não houve redução significativa do valor de RMSECV, conseqüentemente duas VLs foram definidas para construção do modelo de reconhecimento de padrões.

FIGURA 15 – DEFINIÇÃO DO NÚMERO DE VL PARA PLS-DA IV-MÉDIO

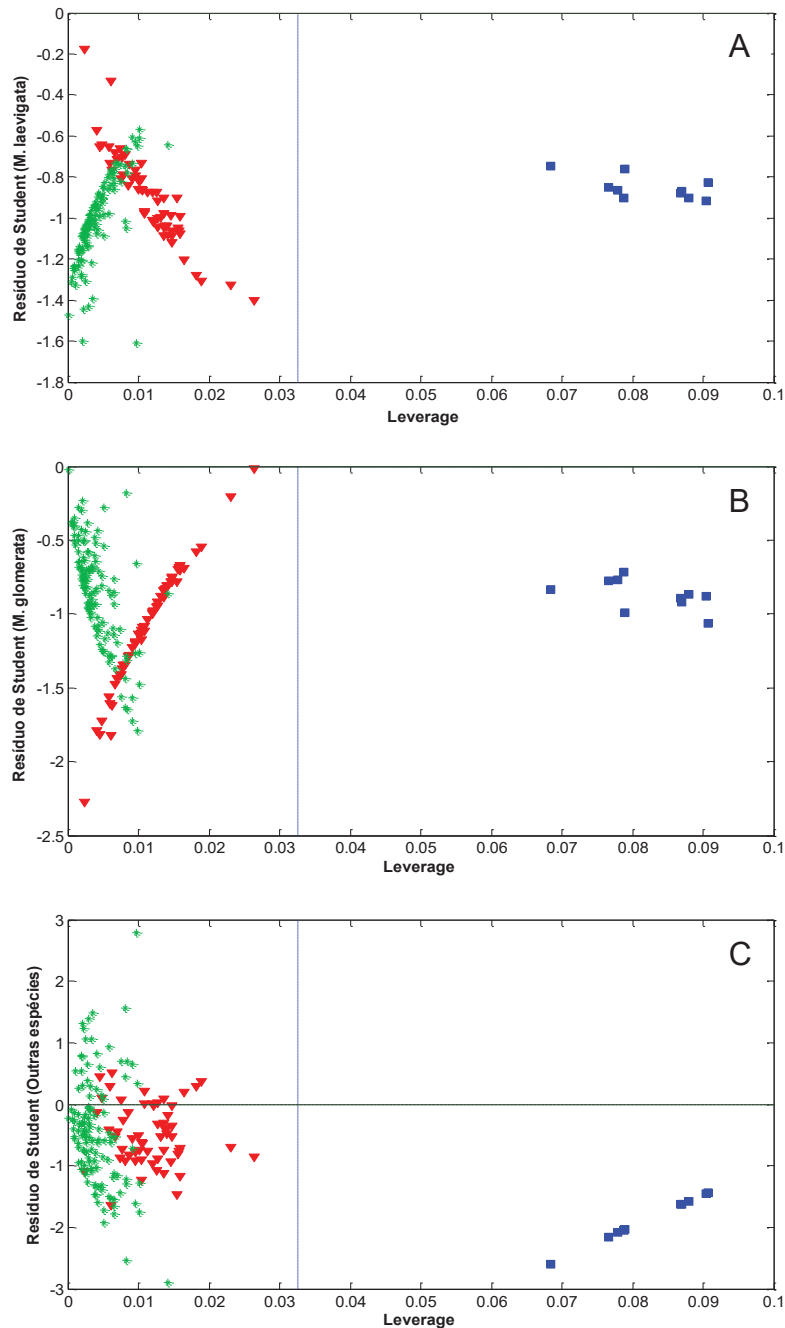


LEGENDA: Azul – classe *M. laevigata*; Verde – classe *M. glomerata*; Vermelho – classe outras espécies.

Já a avaliação de amostras anômalas foi conduzida através do gráfico de alavancagem (*leverage*) versus resíduo de Student. Os gráficos para cada classe são apresentados na FIGURA 16.

O limite de aceitação para o leverage foi calculado considerando o número de VLs definidas para o modelo, duas, multiplicados por três e divididos pelo número de amostras do conjunto de calibração, 189 (ASTM, 2017).

FIGURA 16 – AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS ANÔMALAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO PLS-DA
- IV-MÉDIO



NOTA: Linha pontilhada azul representa limite de aceitação para o *leverage* – 0,032.
LEGENDA: A – classe *M. laevigata*; B – classe *M. glomerata*; C – classe outras espécies; * *M. laevigata*; ▼ *M. glomerata*; ■ Outras espécies.

Conforme observado através dos três gráficos apresentados, todas as amostras da classe de outras espécies, utilizada para desafiar o modelo de classificação, apresentaram *leverage* bastante elevado frente as 3 classes avaliadas. Isso demonstra que o modelo foi capaz de distinguir essas amostras como anômalas ou, em outras palavras, que essas amostras não pertencem ao domínio de calibração.

Essa situação fica clara pela análise do gráfico da FIGURA 17, nesse gráfico de escores todas as amostras da classe de outras espécies ficaram fora do intervalo de confiança de 95% da região de calibração do modelo, o que reforça a capacidade de predição para as amostras das duas espécies de guaco. Caso essas amostras fossem o objetivo da pesquisa, teriam sido removidas do conjunto da calibração para não comprometer o ajuste do modelo, o que não foi o caso.

Já com relação as amostras das duas espécies de guaco, todas apresentaram valores de *leverage* abaixo do limite máximo de aceitação. Significa que nenhuma delas teve um poder de alavancagem suficiente para influenciar na estimativa dos coeficientes de regressão. Quando isso ocorre, há a distorção do coeficiente de regressão na direção da amostra de alto *leverage* com comprometimento do modelo matemático de diferenciação.

Já com relação aos resíduos padronizados de Student, apenas uma das amostras de *M. glomerata* apresentou resíduo acima do limite de $\pm 2,0$ quando avaliada dentro da sua classe. Como essa amostra não apresentou alto *leverage*, não foi removida do modelo, mesmo assim a orientação dessa amostra no gráfico de escores foi monitorada, bem como sua classificação pelo modelo, entretanto não foi observado erro de classificação dessa amostra o que assegurou a possibilidade da sua manutenção no modelo. Com relação à classe das outras espécies, quatro amostras dessa classe, além de três amostras de *M. laevigata*, apresentaram resíduos acima do limite definido, entretanto como esta não era a classe alvo do modelo de classificação, essas amostras não foram excluídas do conjunto de calibração.

Após a validação do conjunto de calibração e seleção das VLs, o conjunto de validação, 81 amostras, foi adicionado ao modelo para avaliar a sua capacidade de predição das duas espécies de guaco e consequentemente identificação das amostras.

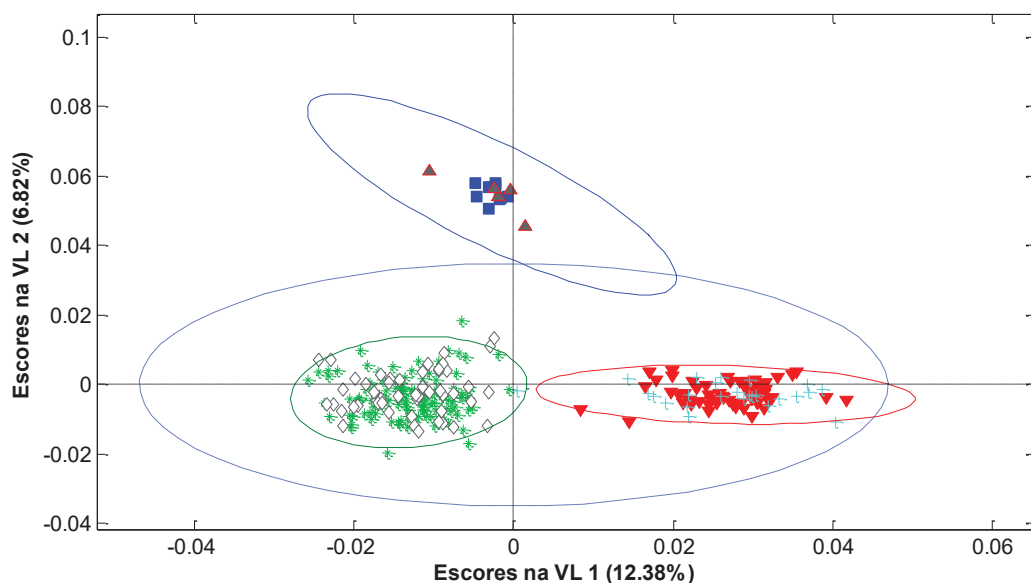
Nessa etapa, foram utilizados como critérios para confirmação da adequação do modelo a inspeção visual do gráfico de escores e os valores de seletividade e sensibilidade.

A inspeção do gráfico de escores, apresentado na FIGURA 17, permite confirmar o correto agrupamento de todas as amostras do conjunto de validação externo junto as suas respectivas classes. Todas as amostras de guaco ficaram localizadas dentro do intervalo de confiança de 95% para a calibração do modelo (linha pontilhada). Para a classe *M. laevigata* cinco amostras permaneceram fora do

intervalo de confiança de 95% para a classe (elipse verde), entretanto, este é um resultado aceitável uma vez que essas amostras permaneceram próximas ao grupo das demais amostras e não foram classificadas de forma errada pelo modelo.

Outro ponto importante a destacar na análise gráfica é a ausência de interpolação entre as elipses de cada uma das classes, o que configura um ótimo ajuste para identificação de cada amostra na sua respectiva classe.

FIGURA 17 – GRÁFICO DE ESCORES PLS-DA – IV-MÉDIO

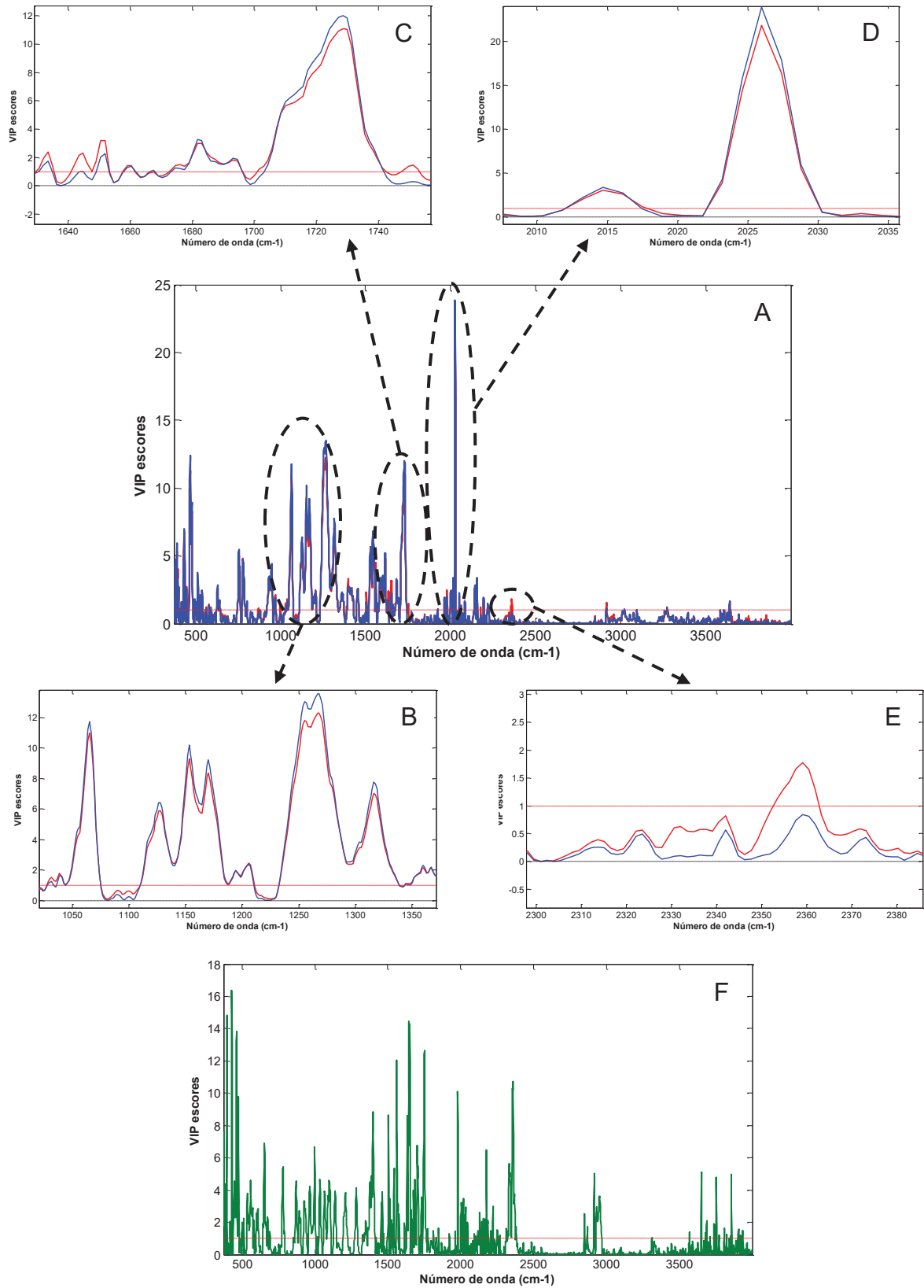


NOTA: Elipses em linha contínua – intervalo de confiança de cada classe com 95% de confiança;
Elipse pontilhada – intervalo de confiança do modelo com 95% de confiança.

LEGENDA: Conjunto de calibração - * *M. laevigata*; ▼ *M. glomerata*; ■ Outras espécies; Conjunto de validação - ◇ *M. laevigata*; + *M. glomerata*; ▲ Outras espécies.

Para avaliar quais regiões dos espectros do infravermelho mais contribuíram para a classificação das amostras em cada classe, foram construídos os gráficos de VIP escores *versus* as variáveis, a FIGURA 18 apresenta os referidos gráficos com destaque para as regiões mais importantes para a classificação.

FIGURA 18 – VIP ESCORES PARA MODELO IV-MÉDIO



LEGENDA: A – VIP escores para as duas classes das espécies de guaco (**Vermelho** – *M. laevigata*; **Azul** – *M. glomerata*); B, C, D e E – destaque das regiões mais importantes do espectro para distinção das espécies de guaco; F – VIP escores para a classe outras espécies; linha pontilhada vermelha – *threshold* para influência da variável.

A avaliação dos gráficos de VIP escores permite evidenciar uma grande semelhança nas regiões do espectro com relevância para a formação das duas classes de guaco, caracterizadas no gráfico por sinais acima da linha pontilhada de *threshold*. Mesmo com essa grande semelhança, as regiões entre 1.050 a 1.350; 1.640 a 1.740; 2.020 a 2.030 e 2.340 a 2.380 cm^{-1} apresentaram diferenças na intensidade da influência de cada classe o que colaborou para a distinção das duas espécies de guaco, conforme as apresentado nas quatro regiões de destaque da FIGURA 18.

Além disso, para as duas classes de guaco os números de onda de 2.500 a 4.000 cm^{-1} poderiam ser eliminados do modelo e não afetariam a separação entre as classes. Entretanto, foi optado por manter esta região do espectro para evitar tratamentos desnecessários aos dados adquiridos e por esta região apresentar informações relevantes para a distinção em relação a classe das outras espécies, conforme a FIGURA 18-F. Para essa última classe, fica evidente que as regiões do espectro com impacto no agrupamento dessas amostras são diferentes em relação às espécies de guaco, o que atesta a capacidade do modelo em reter a informação original dos espectros para classificar as amostra.

Finalmente, a capacidade de predição e ajuste do modelo foi avaliada através das figuras de mérito sensibilidade e seletividade, a TABELA 6 traz as principais figuras de mérito para avaliação do modelo.

TABELA 6 – PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DO AJUSTE DO MODELO PLS-DA - IV-MÉDIO

PARÂMETRO	CLASSE		
	<i>M. laevigata</i>	<i>M. glomerata</i>	Outras espécies
RMSECV	0,6594	0,3674	0,1264
Sensibilidade - Calibração	1,000	1,000	1,000
Seletividade – Calibração	0,986	1,000	1,000
Sensibilidade – Predição	1,000	1,000	1,000
Seletividade – Predição	1,000	1,000	1,000

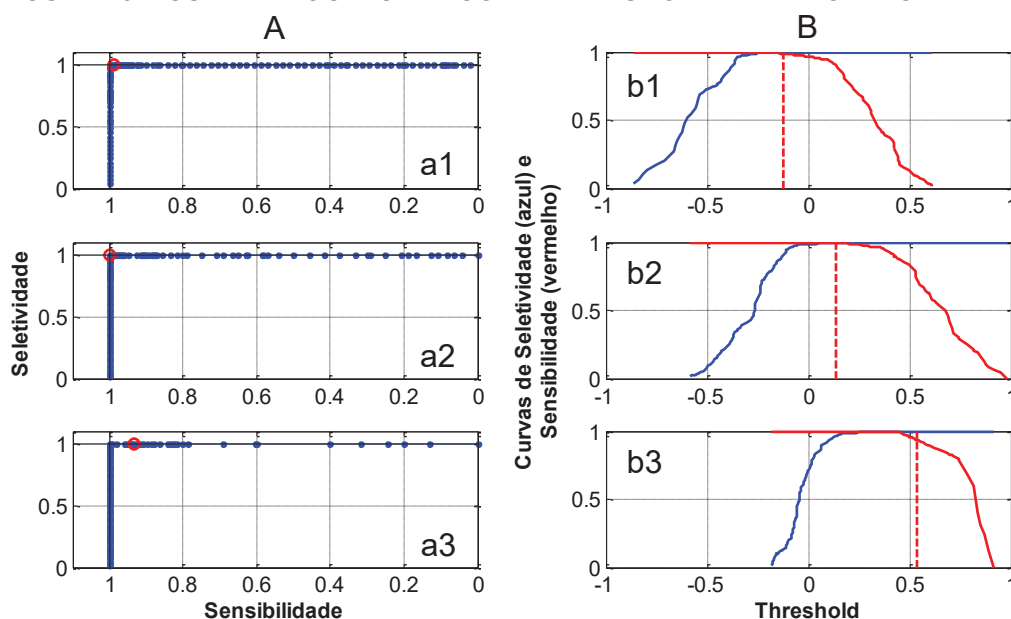
Os valores da tabela para sensibilidade e seletividade para os conjuntos de calibração e predição são bastante elevados, quase todos muito próximos da unidade. Especificamente os valores de sensibilidade e seletividade para o conjunto de predição foram todos iguais a 1,000, isso demonstra que o modelo é capaz de prever corretamente a classificação de amostras nele incluídas para fins de diferenciação das espécies de guaco.

Outra ferramenta usada para avaliar a capacidade de classificação do modelo PLS-DA foram o gráfico das curvas das características de operação do receptor (ROC) e o gráfico dos limites (*threshold*) entre as classes do modelo, FIGURA 19.

A curva ROC representa a correlação entre seletividade e sensibilidade à medida que o valor *threshold* muda, a curva é calculada individualmente para cada classe. Como os dois eixos do gráfico são formados respectivamente por sensibilidade (x) e seletividade (y) que possuem valor ideal 1, um método de classificação perfeito fornece um ponto no canto superior esquerdo do espaço ROC, o que representa máxima sensibilidade e seletividade (KUMAR *et al.*, 2014; SITOIE, 2019).

Pela avaliação do gráfico, é possível confirmar que a sensibilidade e a seletividade consistem principalmente de linhas verticais e horizontais com uma área próxima a um. Isto mostra que os valores y não são previstos aleatoriamente e o modelo PLS-DA obtido é um classificador genuíno.

FIGURA 19 – CURVAS ROC E GRÁFICO DE *THRESHOLD* PARA MODELO IV-MÉDIO



LEGENDA: A – Curva ROC predito (*threshold* destacado pelo círculo vermelho); a1 – classe *M. laevigata*; a2 – classe *M. glomerata*; a3 – classe outras espécies; B – Curva *threshold* respostas previstas (*threshold* destacado pela linha vermelha pontilhada); b1 – classe *M. laevigata*; b2 – classe *M. glomerata*; b3 – classe outras espécies.

Já a curva do *threshold* demonstra os limites calculados através de estatística bayesiana para os valores de y que definem os limiares entre as classes. Os valores dos limiares foram calculados de tal forma que os verdadeiros positivos (sensibilidade) e verdadeiros negativos (seletividade) foram maximizados, ou seja, buscando valores

de sensibilidade e seletividade próximos a 1,00, devido a isso a linha pontilhada vermelha em cada gráfico faz intersecção com as curvas vermelha (sensibilidade) e azul (seletividade) nos pontos ótimos para cada classe. Os *threshold* calculados foram -0,1252; 0,1348 e 0,5389 respectivamente para as classes *M. laevigata*, *M. glomerata* e outras espécies.

Tanto os gráficos de ROC, quanto *threshold* apresentaram seletividade e sensibilidade próximas a 1,00 para as duas classes de guaco, já para a classe das outras espécies fica evidente uma menor sensibilidade, traduzida por uma menor capacidade de detectar verdadeiros positivos da classe. Isso não constitui um problema, uma vez que a classe foi adicionada com o objetivo de desafiar o modelo na distinção de outras espécies vegetais que não *M. glomerata* e *M. laevigata*. Logo, a formação de uma classe homogênea com essas amostras, de tal forma que a estatística aplicada fosse capaz de alocar qualquer espécie vegetal que não pertencente ao guaco dentro deste grupo, não foi o objetivo da construção do modelo de classificação, embora, mesmo assim o resultado apresentado tenha sido bastante satisfatório para um conjunto heterogêneo como esse.

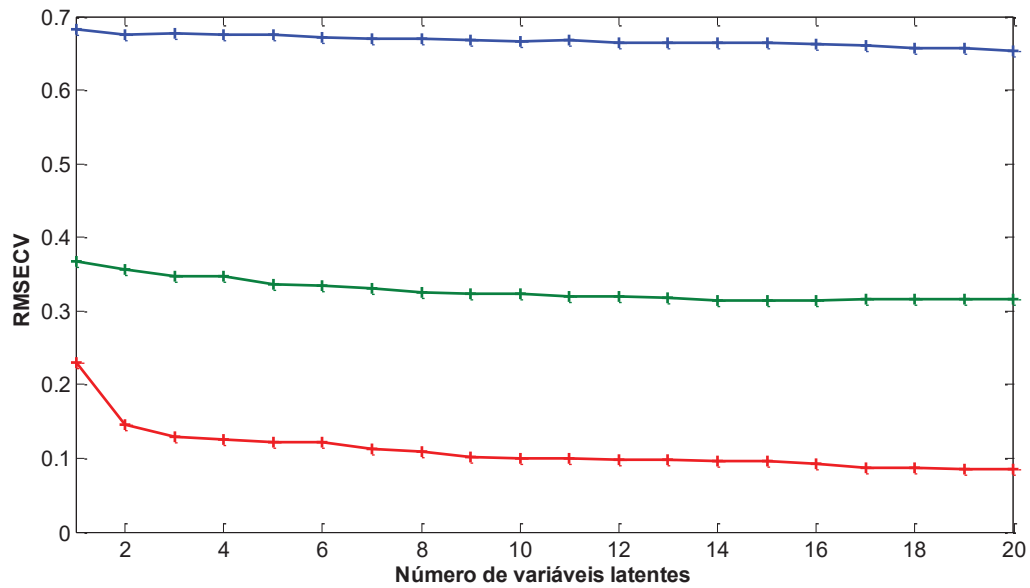
5.1.5 Modelo PLS-DA para identificação das espécies de guaco por IV-próximo

As figuras de mérito e os critérios adotados para a construção do modelo PLS-DA de discriminação das duas espécies de guaco através dos espectros de infravermelho próximo, foram os mesmos discutidos no item anterior para o IV-médio.

Dessa forma, nesse item serão apresentados os resultados obtidos para esse modelo, tendo como base as considerações e discussões previamente apresentadas.

A FIGURA 20 apresenta o gráfico de RMSECV versus o número de variáveis latentes empregado para a definição do número de VLs utilizadas na construção do modelo PLS-DA. Assim como no modelo de IV-médio, o modelo construído para o IV-próximo não apresentou redução significativa no valor de RMSECV a partir da segunda VL para nenhuma das classes, logo duas VLs foram adotadas como o número ideal para construção do modelo de discriminação das amostras vegetais.

FIGURA 20 – DEFINIÇÃO DO NÚMERO DE VL PARA PLS-DA IV-PRÓXIMO

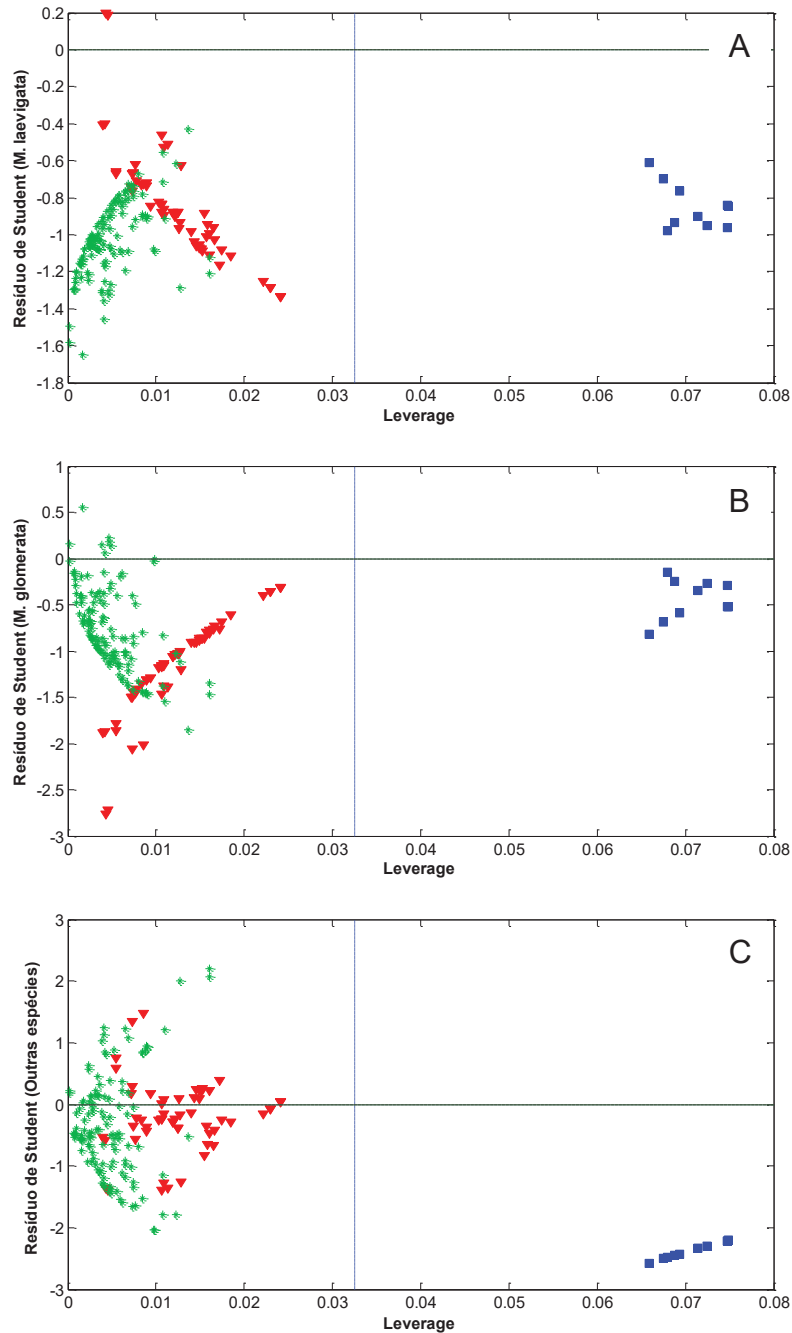


LEGENDA: Azul – classe *M. laevigata*; Verde – classe *M. glomerata*; Vermelho – classe outras espécies.

Já com relação à avaliação das amostras anômalas, mais uma vez a classe de outras espécies apresentou valor de *leverage* acima do limite de 0,032 para todas as amostras do conjunto de calibração. Sendo esse um resultado considerado aceitável conforme já discutido. Também duas amostras da espécie *M. glomerata* apresentaram resíduo de Student acima do limite definido de 2,00 frente a sua classe, entretanto, essas amostras não foram excluídas do conjunto de calibração por apresentarem baixa alavancagem, FIGURA 21.

Já com relação à classe das outras espécies, todas as amostras dessa classe, além de duas amostras de *M. laevigata*, apresentaram resíduos acima do limite definido, mas como esta não era a classe alvo do modelo de classificação, essas amostras não foram excluídas do conjunto de calibração.

FIGURA 21 – AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS ANÔMALAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO PLS-DA
- IV-PRÓXIMO



NOTA: Linha pontilhada azul representa limite de aceitação para o *leverage* – 0,032.
LEGENDA: A – classe *M. laevigata*; B – classe *M. glomerata*; C – classe outras espécies; * *M. laevigata*; ▼ *M. glomerata*; ■ Outras espécies.

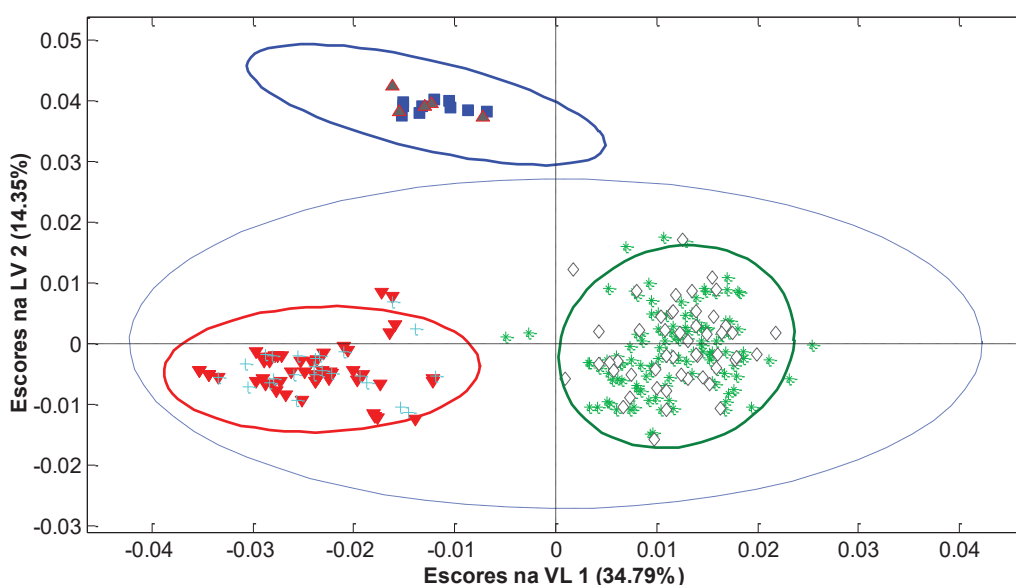
Após a avaliação do conjunto de calibração, foi construído o gráfico de escores na presença das amostras do conjunto de validação externa, 81 amostras, FIGURA 22.

A inspeção visual do gráfico confirma o correto agrupamento de todas as amostras do conjunto de validação externo junto as suas respectivas classes. Todas

as amostras de guaco ficaram localizadas dentro do intervalo de confiança de 95% para a calibração do modelo (linha pontilhada). Para a classe *M. laevigata*, oito amostras permaneceram fora do intervalo de confiança de 95% (elipse verde), enquanto para a classe *M. glomerata* três amostras permaneceram fora do intervalo de confiança de 95% (elipse vermelha). Mesmo assim, esse é um resultado aceitável uma vez que essas amostras permaneceram próximas ao grupo das demais amostras e não foram classificadas de forma errada pelo modelo.

Mais uma vez, não ocorreu interpolação entre as elipses de cada uma das classes, configurando bom ajuste para classificação de cada amostra na sua respectiva classe.

FIGURA 22 – GRÁFICO DE ESCORES PLS-DA – IV-PRÓXIMO

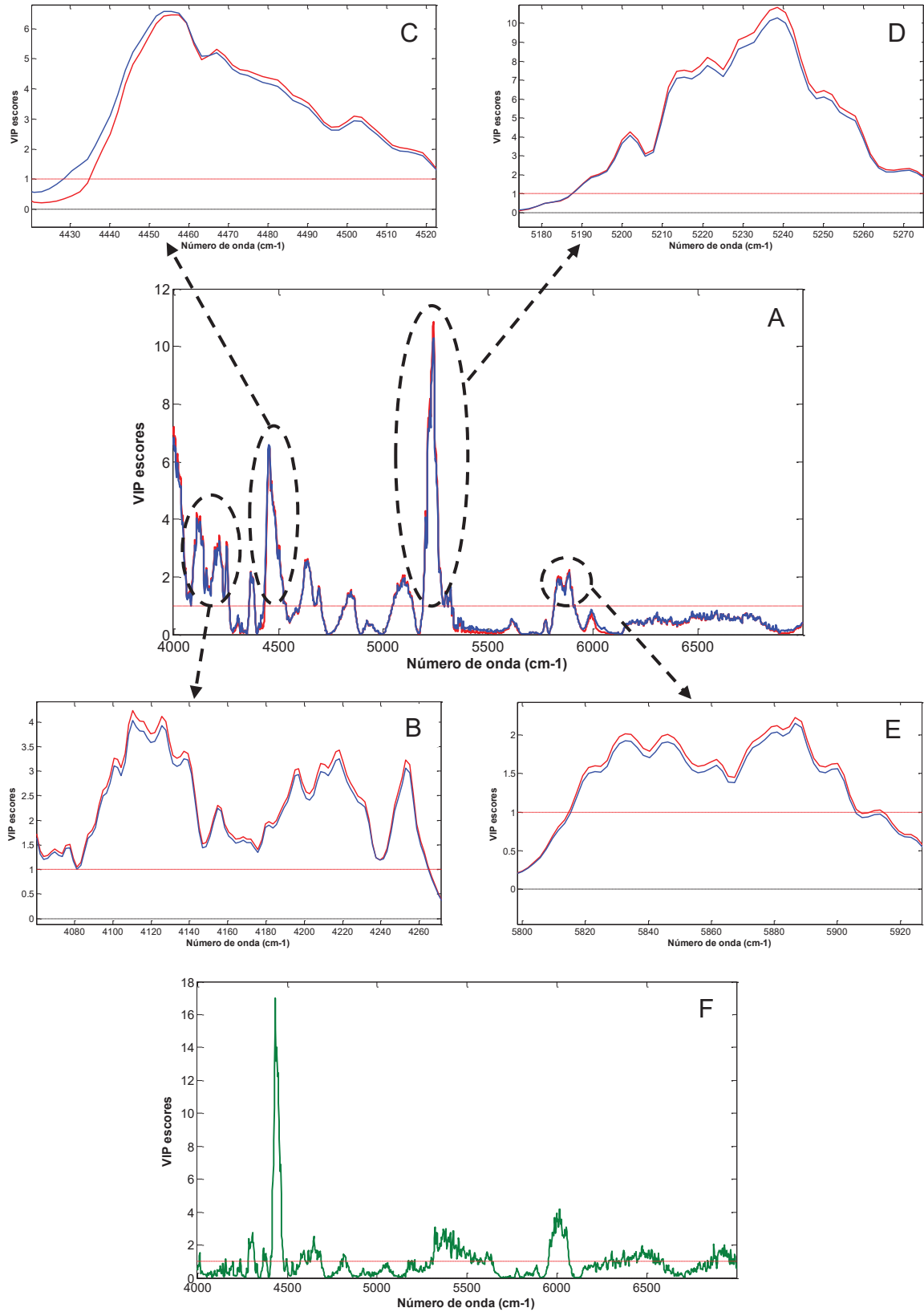


NOTA: Elipses em linha contínua – intervalo de confiança de cada classe com 95% de confiança;
Elipse pontilhada – intervalo de confiança do modelo com 95% de confiança.

LEGENDA: Conjunto de calibração - * *M. laevigata*; ▼ *M. glomerata*; ■ Outras espécies; Conjunto de validação - ◇ *M. laevigata*; + *M. glomerata*; ▲ Outras espécies.

Na FIGURA 23 são destacadas quatro regiões do espectro de infravermelho próximo que contribuíram de forma mais pronunciada para a distinção entre as duas espécies de guaco. O gráfico de VIP escores também permite confirmar a grande semelhança nas contribuições das variáveis para a formação das classes das espécies *M. glomerata* e *M. laevigata*, sendo, porém, bastante diferente as regiões de número de onda com influência para a formação da classe das outras espécies.

FIGURA 23 – VIP ESCORES PARA MODELO IV-PRÓXIMO



LEGENDA: A – VIP escores para as duas classes das espécies de guaco (**Vermelho** – *M. laevigata*; **Azul** – *M. glomerata*); B, C, D e E – destaque das regiões mais importantes do espectro para distinção das espécies de guaco; F – VIP escores para a classe outras espécies; linha pontilhada vermelha – *threshold* para influência da variável.

Nas regiões destacadas entre os números de onda 4.000 a 4.260; 4.430 a 4.520; 5.180 a 5.270 e 5.820 a 5.920 cm^{-1} da FIGURA 23 foram observadas as maiores diferenças nas variáveis que contribuíram para a formação de cada classe das duas espécies de guaco.

Já na FIGURA 23-F é possível confirmar que para a classe das outras espécies, os números de onda responsáveis pela formação da classe são outros em relação às espécies de guaco. Esses resultados confirmam que a região selecionada do infravermelho próximo de 7.000 a 4.000 cm^{-1} foi suficiente para o reconhecimento de padrões das amostras utilizadas.

Como última etapa, a TABELA 7 compila as principais figuras de mérito para avaliação do modelo quimiométrico em IV-próximo.

TABELA 7 – PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DO AJUSTE DO MODELO PLS-DA - IV-PRÓXIMO

PARÂMETRO	CLASSE		
	<i>M. laevigata</i>	<i>M. glomerata</i>	Outras espécies
RMSECV	0,6743	0,3408	0,1470
Sensibilidade - Calibração	0,992	1,000	1,000
Seletividade – Calibração	1,000	1,000	1,000
Sensibilidade – Predição	1,000	1,000	1,000
Seletividade – Predição	1,000	1,000	1,000

Os valores da tabela demonstram que o modelo é capaz de prever corretamente a classificação de amostras nele incluídas para fins de diferenciação das espécies de guaco, uma vez que os valores de sensibilidade e seletividade para o conjunto de predição foram todos iguais a 1,000.

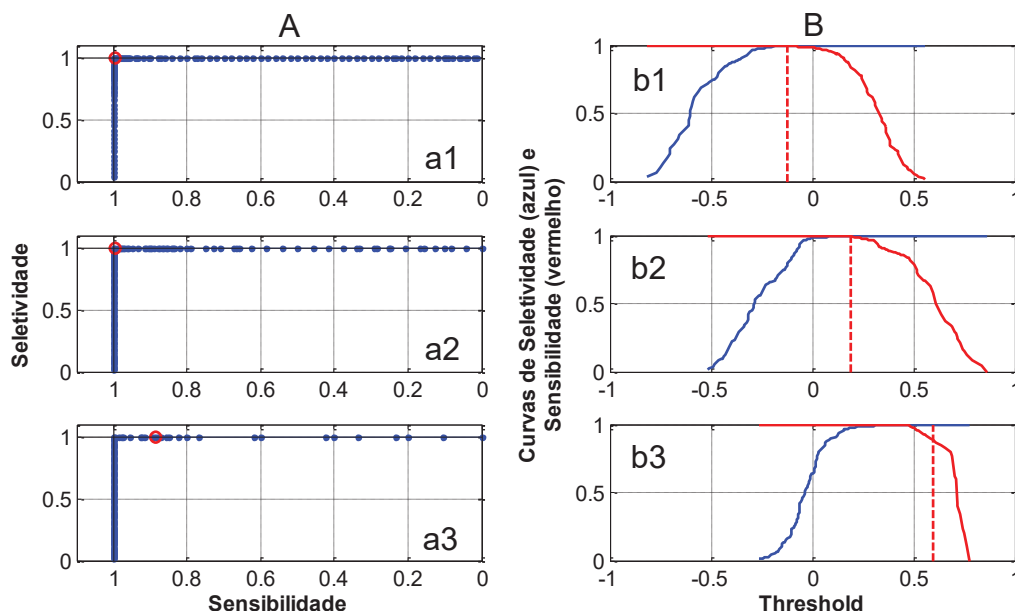
Além disso, os gráficos da curva ROC, FIGURA 24-A, apresentam linhas verticais e horizontais, para seletividade e sensibilidade respectivamente, com uma área próxima a um. Esse resultado mostra que os valores y não são previstos aleatoriamente e o modelo PLS-DA obtido é um classificador genuíno.

Já os gráficos de *threshold*, FIGURA 24-B, apresentam o melhor ajuste da estatística bayesiana para a definição do limiar entre as classes. Os *threshold* calculados foram -0,1256; 0,1878 e 0,5943 respectivamente para as classes *M. laevigata*, *M. glomerata* e outras espécies.

Mais uma vez, tanto os gráficos de ROC, quanto *threshold* apresentaram a seletividade e sensibilidade próximas a 1,00 para as duas classes de guaco. Também para o modelo quimiométrico PLS-DA para IV-próximo, a classe das outras espécies apresentou menor sensibilidade, traduzida por uma menor capacidade na detecção

de verdadeiros positivos da classe. Entretanto, conforme discutido no item anterior, isso não constitui um problema para o modelo de reconhecimento de padrões para as espécies de guaco.

FIGURA 24 – CURVAS ROC E GRÁFICO DE *THRESHOLD* PARA MODELO IV-PRÓXIMO



LEGENDA: A – ROC predito (*threshold* destacado pelo círculo vermelho); a1 – classe *M. laevigata*; a2 – classe *M. glomerata*; a3 – classe outras espécies; B – Respostas previstas (*threshold* destacado pela linha pontilhada); b1 – classe *M. laevigata*; b2 – classe *M. glomerata*; b3 – classe outras espécies.

5.2 ESTUDO CLÍNICO FASE I

5.2.1 Validação do método analítico para o teor dos metabólitos secundários nas soluções orais de guaco

Considerando que os parâmetros de linearidade, LD e LQ para as cinco moléculas avaliadas nas soluções orais já haviam sido previamente avaliados nas amostras de pó das folhas de guaco, esses parâmetros não foram realizados na validação da matriz solução oral. Assim, os parâmetros seletividade, repetibilidade, precisão intermediária e exatidão foram avaliados para cada solução oral obtida a partir das duas espécies de guaco, os resultados estão reportados nos QUADRO 5 e QUADRO 6.

QUADRO 5 – RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-DAD NA MATRIZ SOLUÇÃO ORAL DE *M. laevigata*

PARÂMETRO	CRTÉRIO DE ACEITAÇÃO	RESULTADO AC	RESULTADO AD	RESULTADO OC	RESULTADO CU	RESULTADO CA
Seletividade	- Similaridade do perfil do espectro do pico de interesse na amostra ao padrão de referência. - Pureza de pico > 0,992 - Ausência de interferentes no cromatograma do placebo.	- Perfis similares - Pureza de pico – 0,998 - Ausência de interferentes no placebo	- Perfis similares - Pureza de pico – 0,995 - Ausência de interferentes no placebo	- Perfis similares - Pureza de pico – 0,998 - Ausência de interferentes no placebo	- Perfis similares - Pureza de pico – 0,997 - Ausência de interferentes no placebo	- Perfis similares - Pureza de pico – 0,993 - Ausência de interferentes no placebo
Repetibilidade	Triplicata de três concentrações – baixa, média e alta (µg/mL do analito na amostra). - CV < 4,0%	- 30,0 – 0,60% - 60,0 – 1,64% - 90,0 – 0,52%	- 8,5 – 2,74% - 135,4 – 4,51% - 208,1 – 1,67%	- 5,1 – 1,11% - 10,2 – 1,17% - 15,4 – 0,76%	- 40,0 – 0,21% - 80,0 – 0,14% - 120,0 – 0,31%	- 33,6 – 0,40% - 67,2 – 0,70% - 100,7 – 0,46%
Precisão intermediária	Sextuplicata de três concentrações – baixa, média e alta (µg/mL do analito na amostra). - CV < 6,0%	- 30,0 – 0,43% - 60,0 – 1,72% - 90,0 – 0,86%	- 8,5 – 2,41% - 135,4 – 2,89% - 208,1 – 1,16%	- 5,1 – 1,07% - 10,2 – 1,74% - 15,4 – 1,02%	- 40,0 – 0,30% - 80,0 – 0,51% - 120,0 – 0,63%	- 33,6 – 3,78% - 67,2 – 3,95% - 100,7 – 1,79%
Exatidão	Triplicata de três concentrações – baixa, média e alta (µg/mL do analito na amostra). - Recuperação 80 a 115%	- 30,0 – 93,57% - 60,0 – 80,25% - 90,0 – 109,23%	- 8,5 – 30,97% - 135,4 – 18,14% - 208,1 – 68,93%	- 5,1 – 109,30% - 10,2 – 108,10% - 15,4 – 112,20%	- 40,0 – 96,10% - 80,0 – 91,54% - 120,0 – 97,81%	- 33,6 – 82,21% - 67,2 – 85,34% - 100,7 – 84,62%
Faixa	Intervalo que apresenta linearidade, precisão e exatidão	18,0 a 54,0 µg/mL ou 30,0 a 90,0 µg/mL do analito na amostra	N.A.	3,1 a 9,2 µg/mL ou 5,1 a 15,4 µg/mL do analito na amostra	24,0 a 72,0 µg/mL ou 40,0 a 120,0 µg/mL do analito na amostra	20,2 a 60,4 µg/mL ou 33,6 a 100,7 µg/mL do analito na amostra

LEGENDA: AC – ácido clorogênico; AD – ácido 3,5 dicafeoilquínico; OC. – ácido o-cumárico; CU – cumarina; CA – ácido caurenóico; N.A. – Não aplicável.

QUADRO 6 – RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-DAD NA MATRIZ SOLUÇÃO ORAL DE *M. glomerata*

PARÂMETRO	CRTÉRIO DE ACEITAÇÃO	RESULTADO AC	RESULTADO AD	RESULTADO OC	RESULTADO CU	RESULTADO CA
Seletividade	- Similaridade do perfil do espectro do pico de interesse na amostra ao padrão de referência. - Pureza de pico > 0,992 - Ausência de interferentes no cromatograma do placebo.	- Perfis similares - Pureza de pico – 0,992 - Ausência de interferentes no placebo	- Perfis similares - Pureza de pico – 0,997 - Ausência de interferentes no placebo	N.A.	- Perfis similares - Pureza de pico – 0,995 - Ausência de interferentes no placebo	- Perfis similares - Pureza de pico – 0,992 - Ausência de interferentes no placebo
Repetibilidade	Triplicata de três concentrações – baixa, média e alta (µg/mL do analito na amostra). - CV < 4,0%	- 22,0 – 0,62% - 44,0 – 0,88% - 66,0 – 0,63%	- 180,5 – 1,32% - 361,1 – 1,57% - 541,6 – 2,42%	N.A.	- 3,0 – 1,12% - 17,3 – 0,59% - 26,0 – 0,78%	- 64,7 – 1,55% - 129,5 – 1,38% - 194,2 – 4,95%
Precisão intermediária	Sextuplicata de três concentrações – baixa, média e alta (µg/mL do analito na amostra). - CV < 6,0%	- 22,0 – 0,94% - 44,0 – 0,62% - 66,0 – 0,72%	- 180,5 – 2,44% - 361,1 – 1,37% - 541,6 – 1,70%	N.A.	- 3,0 – 1,10% - 17,3 – 0,67% - 26,0 – 0,68%	- 64,7 – 4,09% - 129,5 – 3,32% - 194,2 – 5,95%
Exatidão	Triplicata de três concentrações – baixa, média e alta (µg/mL do analito na amostra). - Recuperação 80 a 115%	- 22,0 – 109,07% - 44,0 – 100,22% - 66,0 – 105,90%	- 180,5 – 34,53% - 361,1 – 27,77% - 541,6 – 63,68%	N.A.	- 3,0 – 82,13% - 17,3 – 84,24% - 26,0 – 96,44%	- 64,7 – 95,20% - 129,5 – 84,41% - 194,2 – 87,68%
Faixa	Intervalo que apresenta linearidade, precisão e exatidão	13,2 a 39,6 µg/mL ou 22,0 a 66,0 µg/mL do analito na amostra	N.A.	N.A.	1,8 a 15,6 µg/mL ou 3,0 a 26,0 µg/mL do analito na amostra	38,2 a 116,5 µg/mL ou 64,7 a 194,2 µg/mL do analito na amostra

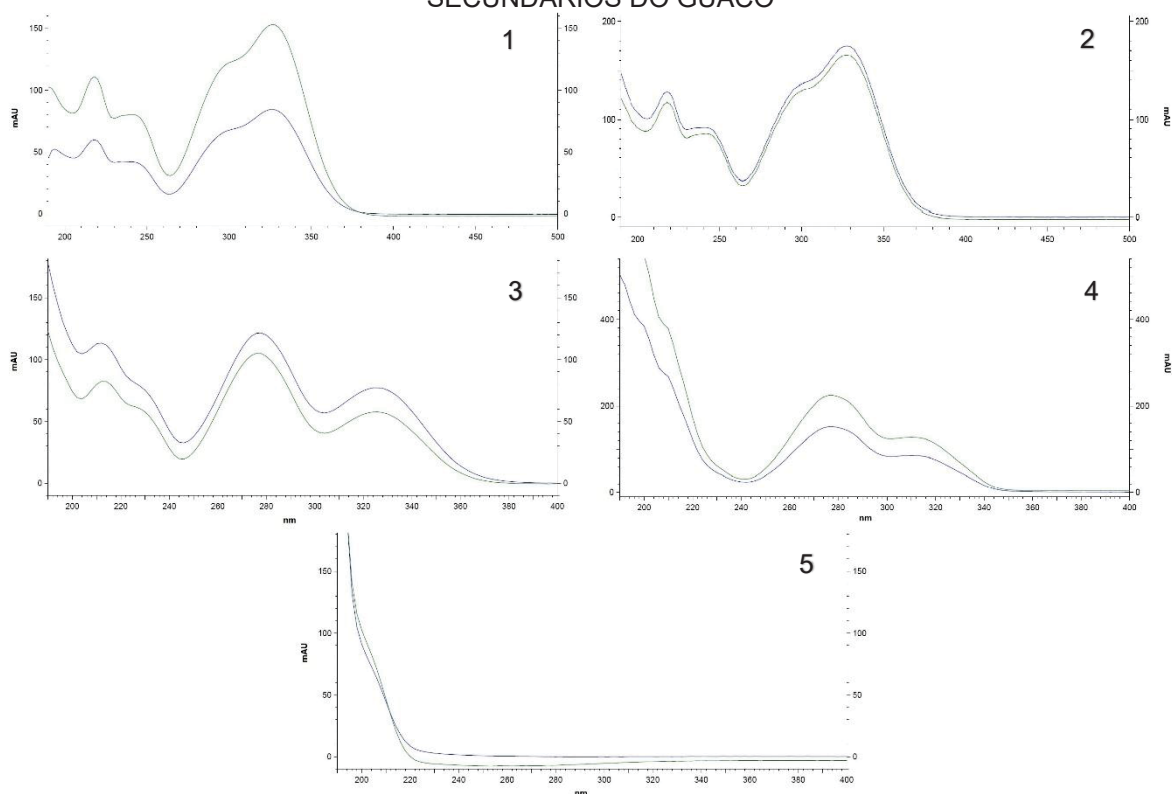
LEGENDA: AC – ácido clorogênico; AD – ácido 3,5 dicafeoilquinico; OC. – ácido o-cumárico; CU – cumarina; CA – ácido caurenóico; N.A. – não aplicável.

Os resultados apresentados nos QUADROS 5 e 6 confirmam a possibilidade de aplicação do método analítico para a quantificação de todos os analitos de interesse com exceção do ácido 3,5 dicafeoilquínico. Para essa molécula os resultados de recuperação no parâmetro de exatidão, para as três concentrações avaliadas nas duas soluções orais, foram abaixo do critério de aceitação.

Considerando que o preparo da amostra utilizado foi apenas a diluição de 6 mL para 10 mL de etanol 70% (v/v) e que não existiram etapas de extração ou partição no preparo da amostra, a falha de recuperação pode ser atribuída a precipitação da molécula do ácido 3,5 dicafeoilquínico quando na presença dos excipientes da fórmula do medicamento, uma vez que a análise das tinturas que deram origem aos medicamentos utilizados na validação apresentaram teores para essa molécula compatíveis com o obtido nas folhas de guaco. Logo, o teor dessa molécula na solução oral através do método analítico desenvolvido não forneceu resultados confiáveis e, portanto, não foi considerado para o restante da pesquisa.

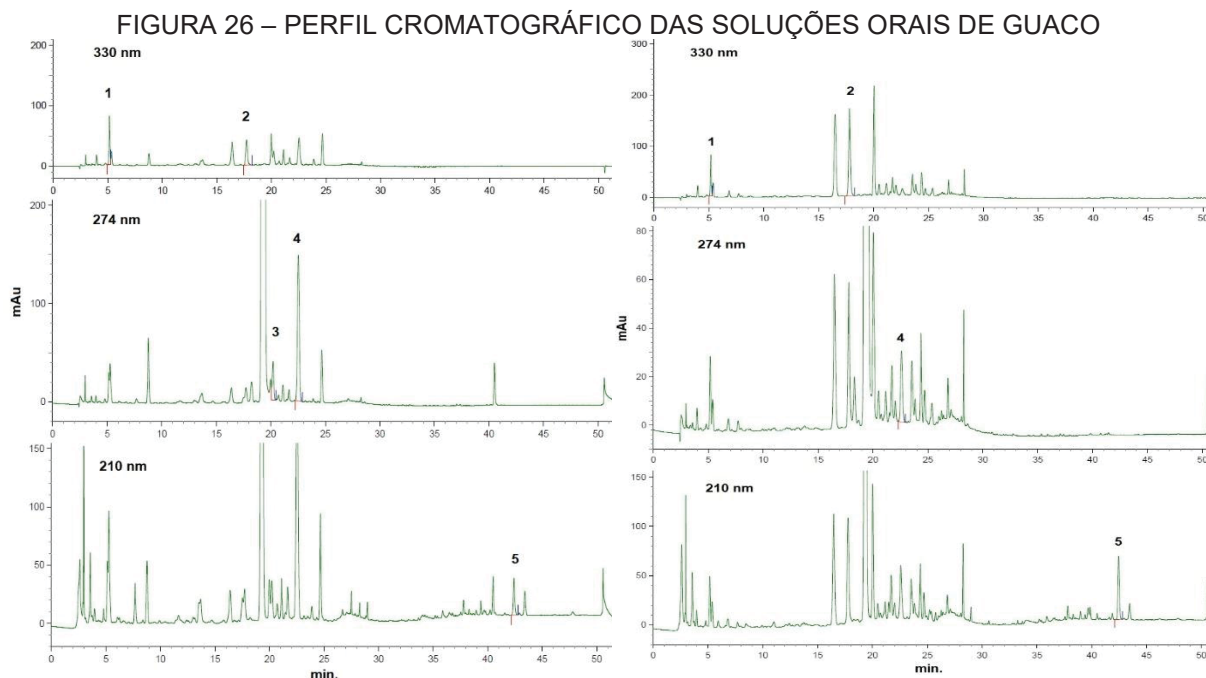
O perfil de absorção na região do ultravioleta para cada uma das moléculas avaliadas comparado ao seu respectivo padrão está apresentado na FIGURA 25.

FIGURA 25 – PERFIS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO GUACO



LEGENDA: 1 – ácido clorogênico; 2 – ácido 3,5 dicafeoilquínico; 3 – ácido o-cumárico; 4 – cumarina; 5 – ácido caurenóico.

Já na FIGURA 26 são apresentados os perfis cromatográficos obtidos para as duas soluções orais de guaco a partir do método validado.



LEGENDA: A – Solução oral *M. laevigata*; B – Solução oral *M. glomerata*; 1 – ácido clorogênico; 2 – ácido 3,5 dicafeoilquínico; 3 – ácido o-cumárico; 4 – cumarina; 5 – ácido caurenóico.

No cromatograma das duas soluções orais é possível identificar um pico com grande intensidade em aproximadamente 19,5 min., tanto no comprimento de onda de 274 nm quanto em 210 nm, que corresponde ao conservante utilizado na formulação, sorbato de potássio. Entretanto, este pico não interferiu na quantificação dos demais analitos de interesse, como demonstrado pela comparação dos perfis espectrais dos picos na amostra em relação aos padrões, bem como pelos resultados de pureza dos picos na amostra.

Finalmente, as intensidades dos sinais dos picos cromatográficos em 330 e 274 nm evidenciam as diferenças nas concentrações dos derivados dos ácidos cafeico e cinâmico respectivamente nas soluções orais obtidas a partir de cada uma das espécies de guaco, e que será discutido no próximo item.

5.2.2 Resultados de controle de qualidade para as soluções orais

As soluções orais produzidas para o estudo clínico foram analisadas frente aos parâmetros de qualidade exigidos pela legislação brasileira. Na TABELA 8 são apresentados os resultados obtidos no controle de qualidade dos medicamentos utilizados no estudo clínico.

TABELA 8 – RESULTADOS DO CONTROLE DE QUALIDADE PARA AS SOLUÇÕES ORAIS

PARÂMETRO	RESULTADOS SOLUÇÃO ORAL	
	<i>M. glomerata</i>	<i>M. laevigata</i>
pH	6,89	7,39
Densidade (g/mL)	1,08	1,08
Ácido clorogênico (mg/mL)	0,062	0,024
Ácido 3,5 dicafeoilquínico (mg/mL)*	0,147	0,008
Ácido o-cumárico (mg/mL)	0,000	0,010
Cumarina (mg/mL)	0,004	0,120
Ácido caurenóico (mg/mL)	0,063	0,047
Contagem de bactérias (UFC/g)	<10	<10
Contagem de bolores e leveduras (UFC/g)	<10	<10
Enterobactérias (NMP/g)	<10	<10
Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. (Aus/10g)	Aus	Aus
Pesquisa de <i>E. coli</i> (Aus/g)	Aus	Aus

NOTA: *Resultado apenas informativo devido a reprovação na exatidão da validação.

LEGENDA: Aus - ausência

Os resultados da tabela demonstram que os medicamentos atenderam aos parâmetros de segurança para serem administrados aos voluntários da pesquisa. Além disso, demonstram as diferenças nas concentrações dos derivados dos ácidos cafeico e cinâmico que foram administrados aos voluntários da pesquisa a partir de cada solução oral.

Com relação especificamente à cumarina, a solução oral produzida a partir da espécie *M. glomerata*, apresentou um resultado muito baixo e bem inferior ao obtido para a espécie *M. laevigata*. Esse resultado reforça a necessidade da condução de estudos clínicos a partir de espécies autênticas do guaco.

Considerando a posologia utilizada no estudo, 15 mL duas vezes ao dia na primeira semana e 30 mL duas vezes ao dia na segunda semana, as quantidades de cada metabólito secundário que foram administradas aos voluntários da pesquisa ao longo de cada semana são apresentadas na TABELA 9.

TABELA 9 – QUANTIDADES DIÁRIAS DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ADMINISTRADAS AOS VOLUNTÁRIOS

ESPÉCIE	POSOLOGIA	METABÓLITO (mg/dia)				
		AC	AD*	OC	CU	CA
<i>M. glomerata</i>	15 mL – 2 x	1,856	4,397	0,000	0,106	1,888
<i>M. laevigata</i>	15 mL – 2 x	0,719	0,254	0,310	3,595	1,418
<i>M. glomerata</i>	30 mL – 2 x	3,713	8,793	0,000	0,213	3,777
<i>M. laevigata</i>	30 mL – 2 x	1,438	0,507	0,621	7,190	2,835

NOTA: *Concentrações apenas informativas devido a reprovação na exatidão da validação.

LEGENDA: AC – ácido clorogênico; AD – ácido 3,5 dicafeoilquínico; OC. – ácido o-cumárico; CU – cumarina; CA – ácido caurenóico; N.A. – Não aplicável.

Os valores apresentados acima demonstram que durante a utilização da solução oral de *M. laevigata* os voluntários receberam 3,60 mg e 7,19 mg de cumarina na primeira e segunda semana de uso respectivamente. Esse é um dado importante considerando que a dose diária preconizada pela Anvisa para o marcador do guaco varia entre 0,5 e 5,0 mg, logo na segunda semana de tratamento os voluntários receberam uma dose 44% maior que a dose máxima orientada pela Agência reguladora.

Por outro lado, para a solução oral de *M. glomerata* as quantidades diárias de cumarina administradas para os voluntários, 0,11 e 0,21 mg, foram inferiores ao mínimo preconizado pela Anvisa de 0,5 mg/dia. Esse é outro dado importante que demonstra não ser a cumarina um marcador adequado para padronização da espécie vegetal *M. glomerata*, bem como não ser adequada a sua utilização para a definição da posologia para a medicação formulada a partir dessa espécie, em contrariedade ao atualmente vigente na legislação brasileira (BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014a). Conforme demonstrado nos resultados apresentados para a construção dos modelos quimiométricos para distinção das duas espécies vegetais, a cumarina é um metabólito secundário minoritário da *M. glomerata*, inexistente ou presente em baixas concentrações na droga vegetal.

Embora não existam limites definidos pela Anvisa para os demais marcadores monitorados nos medicamentos, fica clara a diferença quantitativa entres os medicamentos formulados a partir de cada espécie de guaco. Quando são comparados os teores dos derivados do ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido 3,5 dicafeoilquínico, mesmo que para o segundo os dados não sejam exatos conforme resultados da validação do método analítico, as quantidades diárias desses

marcadores administradas através da solução oral de *M. glomerata* foram entre 2,5 e 17 vezes maiores em relação às administradas com a solução oral de *M. laevigata*.

Essas são informações relevantes e caracterizam, do ponto de vista químico, os medicamentos utilizados na pesquisa, tanto com relação ao perfil, quanto à quantidade dos principais metabólitos secundários do guaco administrados aos voluntários.

5.2.3 Perfil dos voluntários selecionados para o estudo

Foram triados 26 possíveis voluntários para a pesquisa, sete desses indivíduos acabaram não sendo selecionados por apresentarem um ou mais dos critérios de exclusão da pesquisa. Os demais 19 voluntários foram incluídos no estudo e permaneceram ao longo de todas as etapas sem nenhuma desistência ter ocorrido. Todas as etapas da pesquisa foram explicadas para os 19 voluntários incluídos nela e o TCLE foi assinado por cada um para que então fosse iniciado o estudo.

QUADRO 7 – PERFIL DOS VOLUNTÁRIOS DA PESQUISA

PARÂMETRO	RESULTADO	FAIXA
Total de voluntários	19	N.A.
Sexo feminino	12 (63,2%) ^a	N.A.
Sexo masculino	7 (36,8%) ^a	N.A.
Idade (anos)	34,7 ± 7,7 ^b	19 a 49
Peso (kg)	74,3 ± 16,6 ^b	52,0 a 110,0
Altura (m)	1,66 ± 0,10 ^b	1,50 a 1,90
IMC (kg/m ²)	26,5 ± 4,0 ^b	21,0 a 38,1
Tipo sanguíneo A+	9 (47,4%) ^a	N.A.
Tipo sanguíneo A-	1 (5,3%) ^a	N.A.
Tipo sanguíneo B+	2 (10,5%) ^a	N.A.
Tipo sanguíneo AB+	2 (10,5%) ^a	N.A.
Tipo sanguíneo O-	3 (15,8%) ^a	N.A.
Tipo sanguíneo O+	2 (10,5%) ^a	N.A.
Doenças crônicas ^c	Asma (2), Hipotiroidismo (1), Taquicardia (1), Hipertensão (1), Fibromialgia (1)	N.A.

NOTA: ^a número de voluntários e o percentual em relação ao n = 19; ^b média dos 19 voluntários ± desvio padrão; ^c Número de vezes que cada doença foi reportada.

LEGENDA: N.A. – Não aplicável.

O número de voluntários selecionados para o estudo atendeu ao mínimo definido para a pesquisa (N=15), QUADRO 7. Além disso, segundo Soares e

colaboradores (2006) estudos clínicos de fase I são realizados em amostras pequenas que podem variar de 20 a 80 ou 8 a 12 voluntários saudáveis em estudos de doses repetidas realizados em um intervalo mínimo de 14 dias, como foi o caso do presente estudo.

Embora um dos voluntários tenha descrito ser portador de hipertensão, ele não caiu no critério de exclusão pois não apresentou pressão arterial sistólica > 200 mmHg e pressão arterial diastólica > 100 mmHg. Todos os voluntários que descreveram serem portadores de alguma doença crônica foram monitorados ao longo da pesquisa quanto a uma eventual exacerbação do quadro clínico da doença.

Um ponto a ser destacado em relação ao perfil dos voluntários foi o maior número de mulheres em relação a homens, uma vez que não foi conseguido um equilíbrio entre o número de participantes em relação a este critério. Embora esse perfil dos voluntários conduza invariavelmente a um viés da pesquisa, não pode ser caracterizado como um problema para a avaliação dos resultados e conclusão sobre os efeitos da toxicidade do guaco para o organismo humano frente aos parâmetros avaliados. Considerando as particularidades médias do organismo feminino em relação ao masculino, como menor volume corporal e clearance renal, taxa metabólica basal mais lenta e menor volume de sangue, os parâmetros de sangue e clínicos avaliados podem ser afetados de forma mais significativa no organismo feminino no caso de haver alguma toxicidade do guaco. Logo, a amostra permitiu avaliar de forma confiável a segurança das duas espécies vegetais (VAHTER *et al.*, 2007).

5.2.4 Avaliação da segurança de *M. glomerata*

O número de eventos adversos reportados pelos 19 voluntários da pesquisa que passaram pela etapa de utilização da solução oral de *M. glomerata* estão sumarizados no QUADRO 8. Os eventos foram classificados conforme os critérios apresentados nos materiais e métodos.

Dos eventos adversos relatados, os mais frequentes foram em ordem decrescente dor de cabeça (29,5%), pirose (18,2%), dor nas articulações (15,9%) e dor abdominal (12,5%), perfazendo esses quatro eventos adversos 76,1% do total de eventos relatados ao longo das três semanas do estudo com essa espécie. No total foram 88 eventos adversos reportados em 21 dias de estudo, o que representou 4,2

relatos por dia de estudo, considerando os 19 participantes são 0,2 eventos por participante por dia.

QUADRO 8 – EVENTOS ADVERSOS REPORTADOS SOLUÇÃO ORAL DE *M. glomerata*

EVENTO ADVERSO	T0		T1		T2		T3	
	N	I	N	I	N	I	N	I
Confusão mental	0	N.A.	0	N.A.	0	N.A.	0	N.A.
Diarreia	0	N.A.	2	Leve	3	Leve	5	Leve
Dor abdominal	3	Leve	4	Leve	1	Leve	3	Leve
Dor de cabeça	10	Leve	2	Leve	9	Leve	5	Leve
Dor nas articulações	4	Leve	7	Leve	1	Leve	2	Leve
Manchas na pele	0	N.A.	0	N.A.	0	N.A.	0	N.A.
Pirose	2	Leve	2	Leve	7	Leve	5	Leve
Prurido	0	N.A.	2	Leve	1	Leve	3	Leve
Taquicardia	0	N.A.	1	Leve	0	N.A.	0	N.A.
Tonturas e vertigens	1	Leve	0	N.A.	1	Leve	2	Leve
TOTAL	20	N.A.	20	N.A.	23	N.A.	25	N.A.

LEGENDA: N – Número de eventos reportados; I – Intensidade do evento; N.A. – Não aplicável.

Todos os eventos foram classificados como leves uma vez que em todos os casos foram facilmente tolerados e não limitaram as atividades diárias dos voluntários. Com relação à causalidade, os efeitos adversos relatados na literatura para o uso prolongado do guaco em altas doses são aumento da frequência dos batimentos cardíacos, vômitos e quadros diarreicos, que desaparecem com a descontinuação da terapia (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Logo, apenas os relatos descritos de taquicardia e diarreia poderiam ser associados ao uso do medicamento como atribuído ou provável, conforme o critério de classificação adotado descrito nos materiais e métodos.

Considerando a situação descrita acima, associada aos dados apresentados no QUADRO 8 que não evidenciam uma relação temporal com o uso da medicação aos eventos adversos reportados, bem como não apresentam uma melhora na redução dos eventos nas semanas sem o uso da medicação (T0 e T3), os eventos relatados não foram atribuídos ao uso da medicação de solução oral de *M. glomerata*. Já os resultados obtidos para as medições de pressão arterial e análises do sangue dos voluntários ao longo do estudo para a solução oral da espécie *M. glomerata* estão sumarizados na TABELA 10. Todos os parâmetros monitorados foram avaliados quanto a influência do tempo em relação aos resultados, esse foi o critério para se determinar se a utilização da solução oral de guaco exerceu algum efeito negativo e por consequência apresentou algum efeito tóxico para os sistemas alvo monitorados – hematopoiético, endócrino, hepático, renal e cardiovascular.

TABELA 10 – RESULTADOS CLÍNICOS SOLUÇÃO ORAL DE *M. glomerata*

PARÂMETRO	T0**	T1**	T2**	T3**	REFERÊNCIA	QIC	X ²	GL	p
Eritrócitos (milhões/ μ L)	4,81 \pm 0,55	4,75 \pm 0,53	4,84 \pm 0,55	4,78 \pm 0,52	4,0 a 6,1 ^a	9,204 ^e	11,235	3	0,071*
Hemoglobina (g/dL)	14,23 \pm 1,09	14,13 \pm 1,03	14,25 \pm 1,2	14,12 \pm 1,09	11,8 a 17,7 ^a	8,480 ^e	2,528	3	0,470
Hematócrito (mL/dL)	41,88 \pm 3,41	41,69 \pm 3,33	41,99 \pm 3,48	41,78 \pm 3,16	35,0 a 52,0 ^a	8,493 ^e	1,566	3	0,667
Leucócitos (un/ μ L)	5.678,95 \pm 1.279,57	5.794,74 \pm 1.241,18	6.047,37 \pm 1.832,54	5.900 \pm 1.240,07	3.840,0 a 10.900,0 ^a	12,706 ^e	2,760	3	0,430
Basófilos (%)	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 a 2 ^a	-	-	-	-
Eosinófilos (%)	1,63 \pm 1,54	2,21 \pm 1,84	1,74 \pm 1,41	2,11 \pm 2,71	0 a 13 ^a	136,351 ^g	5,260	3	0,154
Neutrófilos segmentado (%)	55,68 \pm 6,91	54,32 \pm 7,81	56,74 \pm 8,99	56,11 \pm 9,75	35 a 70 ^a	9,887 ^e	2,428	3	0,488
Linfócitos (%)	34,32 \pm 6,33	34,89 \pm 6,73	32,79 \pm 8,97	33,42 \pm 7,71	19 a 49 ^a	11,596 ^e	1,915	3	0,590
Monócitos (%)	7,37 \pm 1,64	7,58 \pm 2,09	7,74 \pm 1,66	7,37 \pm 1,38	3 a 12 ^a	11,676 ^e	1,402	3	0,705
Plaquetas (un/ μ L)	277.894,74 \pm 56.223,66	281.526,32 \pm 51.296,92	280.157,89 \pm 44.958,33	277.736,84 \pm 51.426,15	163.000,00 a 421.000,00 ^a	10,749 ^e	0,574	3	0,902
Tempo de protrombina (s)	10,98 \pm 0,25	11,05 \pm 0,29	11,08 \pm 0,33	11,05 \pm 0,27	9,3 a 13 ^b	8,289 ^e	4,484	3	0,214
RNI	1,01 \pm 0,02	1,01 \pm 0,02	1,01 \pm 0,03	1,01 \pm 0,02	0,8 a 1,2 ^b	-	-	-	-
Tempo de trombolastina (s)	33,69 \pm 3,03	32,62 \pm 2,52	32,82 \pm 3,14	32,48 \pm 2,74	25 a 35 ^b	8,798 ^e	6,348	3	0,096
Glicose de jejum (mg/dL)	80,74 \pm 7,25	81,84 \pm 7,9	81,47 \pm 12,22	81,63 \pm 12,11	70 a 100 ^c	9,795 ^e	0,390	3	0,942
Albumina (g/dL)	4,5 \pm 0,22	4,41 \pm 0,26	4,47 \pm 0,2	4,45 \pm 0,29	3,5 a 5,5 ^c	8,367 ^e	3,381	3	0,337
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,11 \pm 0,05	0,1 \pm 0,04	0,11 \pm 0,05	0,11 \pm 0,05	0,0 a 0,3 ^b	8,170 ^f	1,726	3	0,631
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,51 \pm 0,25	0,47 \pm 0,2	0,52 \pm 0,22	0,46 \pm 0,18	< 0,9 ^b	11,257 ^f	5,666	3	0,129
Bilirrubina total (mg/dL)	0,61 \pm 0,3	0,58 \pm 0,24	0,63 \pm 0,26	0,57 \pm 0,22	0,3 a 1,2 ^b	12,791 ^f	4,729	3	0,193
Triglicérides (mg/dL)	111,89 \pm 60,76	112,74 \pm 52,28	118,26 \pm 60,85	111 \pm 57,15	<150,0 ^c	28,020 ^e	0,860	3	0,835
Colesterol total (mg/dL)	183,00 \pm 32,20	181,58 \pm 25,29	188,42 \pm 30,81	179,74 \pm 30,74	< 200,0 ^c	9,981 ^e	9,865	3	0,020*
Fosfatase alcalina (U/L)	61,42 \pm 14,68	57,21 \pm 15,49	62,74 \pm 16,42	61,32 \pm 16,27	30,0 a 120,0 ^c	13,009 ^e	18,990	3	0,000*
GGT (U/L)	21,74 \pm 11,52	19,95 \pm 8,88	21,89 \pm 11,1	22,16 \pm 10,71	8,0 a 50,0 ^c	24,948 ^e	18,686	3	0,000*
ALT (U/L)	22,84 \pm 16,67	18,79 \pm 9,32	19,42 \pm 9,37	18,63 \pm 9,77	10,0 a 40,0 ^c	29,317 ^e	8,067	3	0,045*
AST (U/L)	18,68 \pm 5,16	18,53 \pm 4,8	19,05 \pm 4,12	19,16 \pm 5,96	10,0 a 40,0 ^c	13,525 ^e	1,052	3	0,789
Proteínas totais (g/dL)	7,31 \pm 0,39	7,05 \pm 0,35	7,07 \pm 0,44	7,15 \pm 0,43	5,5 a 9,0 ^c	8,277 ^e	11,562	3	0,009*
Ureia (mg/dL)	30,84 \pm 7,37	29,42 \pm 7,7	27,79 \pm 7,14	31,11 \pm 8,03	13,0 a 43,0 ^c	12,311 ^e	15,459	3	0,001*
Creatinina (mg/dL)	0,84 \pm 0,16	0,83 \pm 0,17	0,84 \pm 0,18	0,82 \pm 0,12	0,5 a 1,3 ^c	9,840 ^f	1,375	3	0,711
Potássio (mEq/L)	4,89 \pm 0,26	4,84 \pm 0,29	4,91 \pm 0,35	4,91 \pm 0,38	3,5 a 5,0 ^c	8,474 ^e	1,302	3	0,729
Sódio (mEq/L)	139,05 \pm 1,75	137,79 \pm 2,04	138,05 \pm 2,09	139,32 \pm 2,21	136,0 a 145,0 ^c	2,370 ^h	18,906	3	0,000*
Pressão diastólica (mmHg)	81,79 \pm 7,51	82,00 \pm 8,04	84,58 \pm 9,04	83,26 \pm 7,99	< 85,0 ^d	8,637 ^e	11,527	3	0,009*
Pressão sistólica (mmHg)	120,47 \pm 12,99	122 \pm 14,19	122,63 \pm 15,15	122,21 \pm 16,63	< 135,0 ^d	8,985 ^e	1,375	3	0,711
Histamina (μ g/dL)	0,06 \pm 0,02	-	0,05 \pm 0,03	-	-	4,029 ^f	0,077	1	0,781

NOTA: * p valor estatisticamente significativo com 95% de confiança; ** Valor da $\bar{x} \pm \sigma$; ^a Referência Valdati e colaboradores (2011); ^b Referência MSD (2018); ^c Referência ABIM (2022); ^d Referência Gus (2005); ^e Referência Gus (2005); ^f Distribuição gamma; ^g Distribuição normal; ^h Distribuição tweedie; ⁱ Distribuição Poisson.

Para dois dos 32 parâmetros monitorados, percentual de basófilos e a razão normalizada internacional (RNI) para o tempo de ativação da protrombina, não foi conduzida análise estatística uma vez que os resultados dos voluntários da pesquisa foram os mesmos ao longo de todos os tempos da pesquisa.

Para os demais parâmetros, o tipo de distribuição que melhor explicou os dados do parâmetro avaliado está indicado pela letra sobrescrita ao valor de QIC na tabela. A distribuição gamma foi a mais adequada para 23 dos parâmetros avaliados, seguida da distribuição linear, que assume distribuição normal para os dados, para cinco dos parâmetros. Já as distribuições tweedie e Poisson foram aplicadas em apenas um parâmetro cada.

A seleção de um modelo de distribuição que melhor descreva os dados para a posterior avaliação estatística é uma das vantagens do emprego da abordagem semiparamétrica de GEE em relação aos métodos tradicionais para medidas repetidas paramétricos (por exemplo ANOVA) e não paramétricos (por exemplo teste de Friedman).

Quando a variável de resultado é aproximadamente gaussiana, os métodos estatísticos para dados longitudinais são bem desenvolvidos, entretanto, o mesmo não vale para resultados não gaussianos. O GEE, originalmente proposto por Liang e Zeger (1986), é uma ferramenta estatística bastante ajustada para tratamento de dados em estudos longitudinais de medidas repetidas não gaussianas.

As equações de estimativa generalizada foram desenvolvidas para produzir estimativas mais eficientes e não viciadas para os parâmetros do modelo de regressão quando se lida com dados correlacionados, pois considera a estrutura de correlação entre as observações. Além disso, permite tratar diferentes tipos de variáveis, binária, discreta, contínua ou ordinal, sendo possível, como citado anteriormente, ajustar o modelo de regressão em função da forma de distribuição que melhor explica a distribuição dos dados, através da avaliação da medida de aderência QIC (AGRANONIK, 2009).

Como consequência, essas características tornam o GEE uma ferramenta estatística mais versátil e robusta, quando comparada às ferramentas estatísticas tradicionais, para a avaliação das correlações entre os dados de um estudo longitudinal.

Para nove dos 32 dos parâmetros monitorados, o teste estatístico resultou em um valor de $p < 0,05$, significando que os resultados desses parâmetros sofreram influência com o tempo do estudo. Para os demais parâmetros não houve evidência

estatisticamente significativa de um efeito da utilização da solução oral de *M. glomerata* sobre o parâmetro.

Para o sistema hematopoiético e fatores de coagulação, apenas na contagem dos eritrócitos foi acusada variação estatisticamente significativa com o passar do tempo. Para os demais parâmetros monitorados desse sistema não houve influência do tempo. O resultado obtido para os fatores de coagulação, tempo de ativação de protrombina, tempo de tromboplastina e RNI são particularmente importantes pois demonstram a inexistência de ação anticoagulante da espécie em estudo tanto para a via intrínseca, quanto para a via extrínseca de coagulação. Esse resultado contraria o previamente reportado por outras referências que descrevem a *M. glomerata* com potencial efeito anticoagulante, devido a presença de cumarinas (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; DOS SANTOS, 2005). Entretanto, conforme demonstrado na primeira parte do projeto, a concentração de derivados do ácido cinâmico, dentre esses a cumarina, são muito baixos nessa espécie vegetal e, conseqüentemente, não poderiam ser associados a essa suposta atividade, que fica demonstrada não existir para a espécie em questão.

O parâmetro histamina foi monitorado para avaliar um eventual efeito modulador das espécies de guaco sobre essa molécula. A histamina foi escolhida uma vez que a principal alegação para uso do guaco é como broncodilatador para o caso de inflamações das vias aéreas. (BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014a). Essa alegação é suportada pela existência de alguns trabalhos publicados sobre a atividade anti-inflamatória do guaco em diferentes modelos *in vitro* e animais, como edema da pata, intraperitoneal e pleurisia em ratos. (ALVES *et al.*, 2009; DELLA PASQUA *et al.*, 2019; SUYENAGA *et al.*, 2002).

Além desses trabalhos, existem evidências também publicadas sobre o efeito broncodilatador e anti-inflamatório do guaco em modelos de inflamação das vias aéreas simulando doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma e pneumonia alérgica (DOS SANTOS *et al.*, 2006; FREITAS *et al.*, 2008; POSSEBON *et al.*, 2018; SOARES DE MOURA *et al.*, 2002).

Logo, como algumas das inflamações das vias aéreas, como o caso da asma, possuem um forte componente alérgico significativamente mediado na sua resposta precoce pela histamina, conforme apresentado por Goldsby, Kindt e Osborne (2002), e que o trabalho de Della Pasqua e colaboradores (2019) conclui que a atividade anti-inflamatória do guaco está provavelmente correlacionada a outros metabólitos

secundários que não apenas a cumarina, a histamina foi selecionada para monitoramento no sangue dos voluntários uma vez que um trabalho publicado por Cho de colaboradores (2010) encontrou efeito inibitório de diterpenos do tipo caureno provenientes das raízes de *Aralia cordata* na liberação de histamina em um modelo animal de asma em porquinhos da Índia. Desta forma, como o ácido caurenóico foi a molécula dentre os metabólitos secundários com uma distribuição mais proporcional entre as duas espécies de guaco investigadas (TABELA 9), foi optado por se investigar a hipótese de uma eventual modulação pelo guaco sobre a histamina, mediador químico pró-inflamatório, no sangue dos voluntários da pesquisa com a finalidade de orientar um futuro estudo de fase II para avaliação da eficácia do guaco na redução do processo inflamatório nas vias aéreas de pacientes asmáticos.

Conforme apresentado, a histamina não foi apontada pelo teste estatístico como tendo sofrido influência do tempo na sua variação, para confirmar esse resultado foi realizado o Teste *t* entre as médias do T0 e T2, sendo encontrado o valor de $p = 0,790$, o que confirma que os resultados não são estatisticamente diferentes com 95% de confiança. Na posologia avaliada, o resultado obtido não indica a possibilidade de um efeito anti-inflamatório para a *M. glomerata* como sendo resultado da inibição sobre a liberação de histamina na corrente sanguínea.

Finalmente, para os demais sistemas monitorados foram encontrados parâmetros que sofreram efeito do tempo sobre o seu resultado, sendo que a dimensão desse efeito e os resultados da comparação de cada semana de estudo em relação ao T0 estão tabulados na TABELA 11.

TABELA 11 – DETALHAMENTO SOBRE OS PARÂMETROS CLÍNICOS QUE SOFRERAM EFEITO DO TEMPO – *M. glomerata*

PARÂMETRO	T	$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$	IC – 95%		β (IC – 95%)	<i>p</i>
			BAIXO	ALTO		
Eritrócitos (milhões/ μ L)	0	4,812 \pm 0,124	4,575	5,061	N.A.	N.A.
	1	4,752 \pm 0,119	4,524	4,991	-0,013 (-0,028 a 0,003)	0,105
	2	4,836 \pm 0,123	4,602	5,083	0,005 (-0,008 a 0,018)	0,433
	3	4,776 \pm 0,117	4,553	5,010	-0,007 (-0,021 a 0,007)	0,296
Colesterol total (mg/dL)	0	183,000 \pm 7,189	169,438	197,647	N.A.	N.A.
	1	181,579 \pm 5,646	170,843	192,990	-0,008 (-0,056 a 0,041)	0,753
	2	188,421 \pm 6,879	175,410	202,398	0,029 (-0,018 a 0,076)	0,225
	3	179,737 \pm 6,863	166,777	193,704	-0,018 (-0,068 a 0,032)	0,480
Fosfatase alcalina (U/L)	0	61,421 \pm 3,279	55,320	68,195	N.A.	N.A.
	1	57,211 \pm 3,458	50,819	64,406	-0,071 (-0,113 a -0,029)	0,001*
	2	62,737 \pm 3,668	55,945	70,353	0,021 (-0,028 a 0,070)	0,399
	3	61,316 \pm 3,632	54,595	68,864	-0,002 (-0,046 a 0,042)	0,939
GGT (U/L)	0	21,737 \pm 2,573	17,236	27,413	N.A.	N.A.
	1	19,947 \pm 1,983	16,417	24,237	-0,086 (-0,150 a -0,021)	0,009*
	2	21,895 \pm 2,479	17,538	27,334	0,007 (-0,036 a 0,050)	0,740
	3	22,158 \pm 2,393	17,932	27,380	0,019 (-0,039 a 0,077)	0,516
ALT (U/L)	0	22,842 \pm 3,723	16,597	31,438	N.A.	N.A.
	1	18,790 \pm 2,081	15,123	23,344	-0,195 (-0,361 a -0,029)	0,021*
	2	19,421 \pm 2,093	15,724	23,987	-0,162 (-0,346 a 0,022)	0,084
	3	18,632 \pm 2,181	14,813	23,435	-0,204 (-0,382 a -0,025)	0,025*
Proteínas totais (g/dL)	0	7,311 \pm 0,087	7,142	7,483	N.A.	N.A.
	1	7,047 \pm 0,077	6,898	7,200	-0,037 (-0,060 a -0,013)	0,002*
	2	7,068 \pm 0,097	6,880	7,262	-0,034 (-0,063 a -0,005)	0,024*
	3	7,153 \pm 0,097	6,965	7,345	-0,022 (-0,043 a -0,001)	0,039*
Ureia (mg/dL)	0	30,842 \pm 1,646	27,778	34,244	N.A.	N.A.
	1	29,421 \pm 1,719	26,238	32,991	-0,047 (-0,144 a 0,050)	0,340
	2	27,790 \pm 1,594	24,835	31,096	-0,104 (-0,171 a -0,037)	0,002*
	3	31,105 \pm 1,794	27,781	34,828	0,008 (-0,082 a 0,099)	0,854
Sódio (mEq/L)	0	139,053 \pm 0,390	138,290	139,819	N.A.	N.A.
	1	137,790 \pm 0,456	136,898	138,687	-0,009 (-0,016 a -0,003)	0,006*
	2	138,053 \pm 0,468	137,139	138,972	-0,007 (-0,015 a 0,001)	0,083
	3	139,316 \pm 0,494	138,351	140,287	0,002 (-0,007 a 0,011)	0,689
Pressão diastólica (mmHg)	0	81,790 \pm 1,677	78,568	85,143	N.A.	N.A.
	1	82,000 \pm 1,796	78,555	85,596	0,003 (-0,022 a 0,027)	0,836
	2	84,579 \pm 2,018	80,714	88,629	0,034 (0,011 a 0,057)	0,004*
	3	83,263 \pm 1,783	79,841	86,832	0,018 (-0,011 a 0,047)	0,229

NOTA: * *p* valor estatisticamente significativo com 95% de confiança

O efeito do tempo sobre os resultados para eritrócitos e colesterol total não resultou em um valor de $p < 0,05$ para diferença média dos resultados (β) de nenhum dos tempos quando comparados ao T0. No teste *post hoc* de Sidak foi observado na comparação entre os tempos T2 e T3 um valor de $p = 0,050$ e $p = 0,064$ respectivamente para os eritrócitos e colesterol total, o que explicaria o teste estatístico ter retornado haver influência do tempo sobre o parâmetro. Assim, foi alterado o tempo referência para o T3 para a comparação dos demais tempos do estudo no software estatístico. Com essa alteração foi obtida uma β do T2 em relação ao T3 para os eritrócitos mais próxima da significância, 0,013 (95% IC, 0,000 a 0,025,

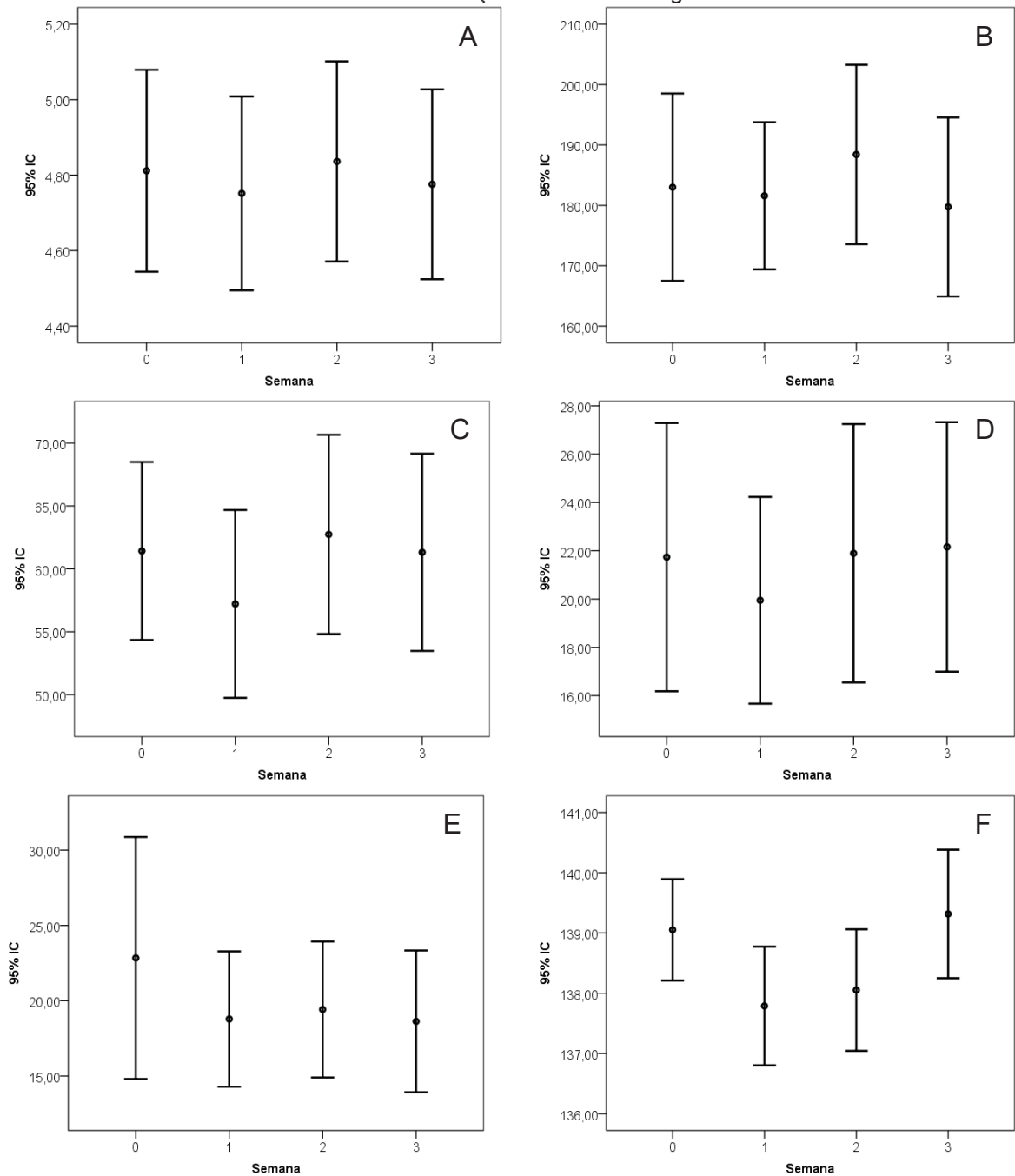
$p = 0,053$), porém ainda não caracterizada como estatisticamente diferente. Já o T2 para colesterol total apresentou diferença estatisticamente significativa ao T3, 0,047 (95% IC, 0,011 a 0,084, $p = 0,011$). Considerando esses resultados, o efeito do tempo sobre esses dois parâmetros pode ser classificado como inespecífico e não correlacionado diretamente ao uso da solução oral de *M. glomerata* à variação nos seus resultados.

Com relação aos parâmetros fosfatase alcalina e GGT, o valor de β de T1 para ambos apresentou significância estatística, $p = 0,001$ e $p = 0,009$ respectivamente, porém os demais tempos não apresentaram a mesma significância. Esse resultado mais uma vez representou uma variação inespecífica dos parâmetros com a utilização da solução oral, principalmente considerando que no T2 a dose utilizada do medicamento pelos voluntários foi o dobro da utilizada no T1 e para ele não foi observada diferença significativa em relação ao T0. Essa conclusão ficou mais clara através da avaliação do teste *post hoc*, o p valor para a comparação dos pares de médias para fosfatase alcalina resultou estatisticamente significativo apenas para as comparações de T1 em relação aos demais tempos, T1/T0 – $p = 0,003$, T1/T2 – $p = 0,001$ e T1/T3 – $p = 0,002$. De igual forma, para o parâmetro GGT a variação ficou restrita ao T1, com variação estatisticamente significativa para os pares T1/T2 – $p = 0,019$ e T1/T3 – $p = 0,009$, e ausência de significância o par T1/T0 – $p = 0,156$.

A mesma conclusão descrita no parágrafo anterior foi estendida aos parâmetros ALT e sódio, essa conclusão foi fundamentada mais uma vez na ausência de significância estatística da variação do parâmetro em T2 em relação ao T0. Além disso, o teste de Sidak para ALT não apresentou significância para nenhum dos pares de tempos, já para o sódio a significância estatística ficou restrita aos pares T1/T0 – $p = 0,034$ e T1/T3 – $p = 0,017$.

Na FIGURA 27 são apresentados os gráficos de barra de erro para as médias e seus respectivos IC – 95% em cada tempo para os parâmetros anteriormente discutidos. A visualização dos gráficos auxilia na confirmação da ausência de correlação do uso da solução oral de *M. glomerata* à variação dos resultados desses parâmetros.

FIGURA 27 – GRÁFICOS DE BARRA DE ERRO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS SEM EFEITO ASSOCIADO À SOLUÇÃO ORAL DE *M. glomerata*



LEGENDA: A – Eritrócitos (milhões/μL); B – Colesterol total (mg/dL); C – Fosfatase alcalina (U/L); D – GGT (U/L); E – ALT (U/L); F – Sódio (mEq/L).

Finalmente, os parâmetros de proteínas totais, ureia e pressão diastólica foram indicados pela análise estatística como tendo apresentado significância estatística dos valores de β de T2 e/ou T1 em relação ao T0, o que evidencia correlação da alteração do parâmetro com o tempo e conseqüentemente a utilização da solução oral de *M. glomerata*.

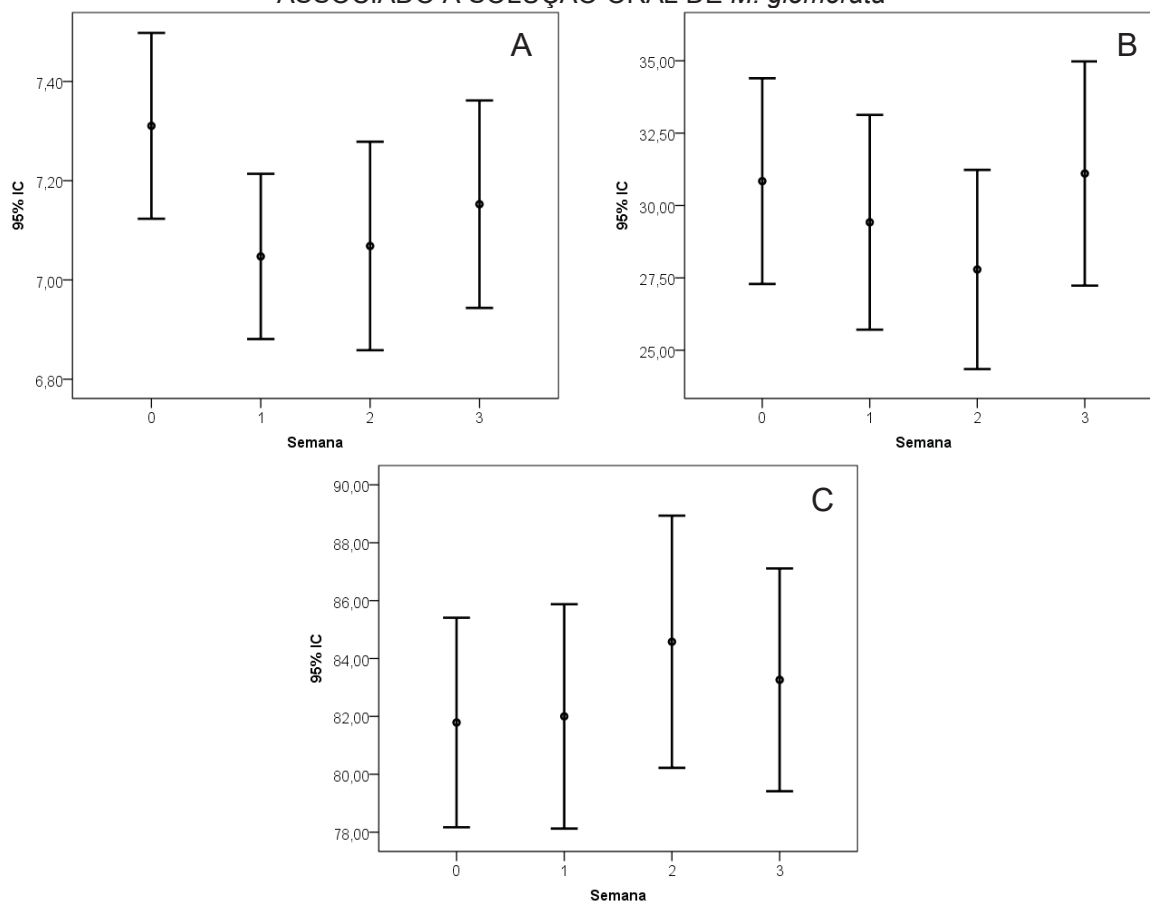
Para os dois primeiros parâmetros citados no parágrafo anterior, a redução nos valores médios de T1 e T2 em relação ao T0 e posterior aumento do valor médio em T3 indicam uma correlação clara do uso da medicação com a consequente alteração dos resultados desses parâmetros.

Mesmo com as alterações identificadas e correlacionadas ao uso da medicação, apenas para o parâmetro ureia um dos voluntários sofreu alteração com dois resultados maiores do que o limite máximo aceitável para o parâmetro no T1 e T3, 45 e 47 mg/dL respectivamente. Os demais resultados não variaram para além dos limites aceitáveis para indivíduos saudáveis. Além disso, as reduções observadas nos valores são de menor relevância clínica quando comparadas, por exemplo, ao aumento nos resultados desses dois parâmetros, sendo que a redução geralmente é associada à baixa ingestão de proteínas na dieta ou aumento na excreção renal. Esses dois últimos fatos, associados ao fato de que todos os demais marcadores hepáticos e renais monitorados – albumina, bilirrubinas, fosfatase alcalina, GGT, ALT, AST, creatinina, potássio e sódio – não apresentaram alterações significativas durante as duas semanas de utilização da medicação, contribuem para atestar a segurança da espécie *M. glomerata* para fígado, rins e sistema endócrino. Esse resultado confronta o previamente reportado de que pacientes com problemas hepáticos podem apresentar toxicidade com o uso prolongado da medicação, sendo desaconselhável a utilização da espécie *M. glomerata* nesses casos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Já para o parâmetro pressão diastólica, a diferença média dos resultados em T2 foi significativamente diferente da obtida em T0, $p = 0,004$, com a redução do valor médio do parâmetro após a suspensão do uso da medicação em T3. Embora esse fato confirme um efeito do uso da medicação sobre o parâmetro, para a pressão sistólica dos voluntários não foi evidenciado o mesmo efeito do tempo / uso da medicação sobre o parâmetro. Logo, os resultados encontrados para os dois parâmetros de monitoramento da pressão arterial, pressão diastólica e sistólica, quando associados entre si não confirmam um efeito de aumento da pressão arterial ao uso da espécie *M. glomerata* por humanos.

A FIGURA 28 apresenta os gráficos de barra de erro das médias e seus respectivos IC – 95% em cada tempo para os parâmetros acima discutidos. A visualização dos gráficos auxilia na confirmação da correlação do uso da solução oral de *M. glomerata* à variação dos resultados desses parâmetros.

FIGURA 28 – GRÁFICOS DE BARRA DE ERRO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS EFEITO ASSOCIADO À SOLUÇÃO ORAL DE *M. glomerata*



LEGENDA: A – Proteínas totais (g/dL); B – Ureia (mg/dL); C – Pressão diastólica (mmHg).

Conseqüentemente, embora tenham sido correlacionados efeitos da utilização da solução oral de *M. glomerata* sobre as proteínas totais e ureia no sangue, além da pressão arterial diastólica, esses efeitos não foram considerados tóxicos e/ou negativos para esses parâmetros.

Conforme previamente discutido, também não foram atribuídos eventos adversos ao uso da medicação, bem como não foi correlacionado efeito do seu uso aos demais parâmetros monitorados no estudo. Desta forma é possível afirmar sobre a segurança da solução oral de *M. glomerata* dentro da posologia administrada e para os parâmetros monitorados no estudo.

Considerado que, conforme demonstrado na etapa analítica do trabalho, o grupamento químico majoritário do metabolismo secundário da espécie são os derivados do ácido cafeico, os resultados acima apresentados estão em concordância com estudos clínicos prévios conduzidos em espécies também ricas nessas moléculas. Como exemplo, estudos clínicos conduzidos com a espécie *Cynara cardunculus* L. (sin. *Cynara scolymus* L.), popularmente conhecida como alcachofra,

que contém quantidades significativas de ácido clorogênico e cinarina (ácido 1,5 dicafeoilquínico), não relataram eventos adversos com relevância, além de reportarem ausência de alterações significativas nos parâmetros de sangue monitorados nos voluntários da pesquisa (HOLTMANN *et al.*, 2003; KIRCHHOFF *et al.*, 1994).

5.2.5 Avaliação da segurança de *M. laevigata*

O número de eventos adversos reportados pelos 19 voluntários da pesquisa que passaram pela etapa de utilização da solução oral de *M. laevigata* estão sumarizados no QUADRO 9. Assim como para a espécie anterior, os eventos foram classificados conforme os critérios apresentados nos materiais e métodos.

Dos eventos adversos relatados, os mais frequentes foram em ordem decrescente pirose (23,4%), dor de cabeça (20,7%), diarreia (18,0%) e prurido (9,9%), perfazendo esses quatro eventos adversos 72,0% do total de eventos relatados ao longo das três semanas do estudo com essa espécie. No total foram 111 eventos adversos reportados em 21 dias de estudo, o que representou 5,3 relatos por dia de estudo, considerando os 19 participantes são 0,3 eventos por participante por dia.

QUADRO 9 – EVENTOS ADVERSOS REPORTADOS SOLUÇÃO ORAL DE *M. laevigata*

EVENTO ADVERSO	T0		T1		T2		T3	
	N	I	N	I	N	I	N	I
Confusão mental	0	N.A.	0	N.A.	0	N.A.	0	N.A.
Diarreia	10	Leve	6	Leve	4	Leve	0	N.A.
Dor abdominal	6	Leve	0	N.A.	1	Leve	1	Leve
Dor de cabeça	4	Leve	7	Leve	9	Leve	3	Leve
Dor nas articulações	3	Leve	2	Leve	0	N.A.	4	Leve
Manchas na pele	0	N.A.	0	N.A.	0	N.A.	0	N.A.
Pirose	10	Leve	10	Leve	3	Moderado	3	Leve
Prurido	4	Leve	4	Leve	3	Leve	0	N.A.
Taquicardia	5	Leve	2	Leve	2	Leve	0	N.A.
Tonturas e vertigens	2	Leve	2	Leve	0	N.A.	1	Leve
TOTAL	44	N.A.	33	N.A.	22	N.A.	12	N.A.

LEGENDA: N – Número de eventos reportados; I – Intensidade do evento; N.A. – Não aplicável.

Um evento de pirose ocorrido na segunda semana de utilização da solução oral foi classificado como moderado, uma vez que foi reportado ocorrer sempre na primeira tomada de 30 mL do medicamento no dia, persistindo seus sintomas ao longo da manhã com intensidade para interferir nas atividades diárias. Desta forma, o voluntário foi orientado a dividir esta primeira tomada da manhã em duas porções de

15 mL ingeridas com um intervalo de ao menos 3 h entre elas. A alteração na administração do medicamento eliminou o sintoma e permitiu ao voluntário concluir a segunda semana de uso da medicação. Esse voluntário declarou no início da pesquisa fazer uso diário de dexlansoprazol, um medicamento bloqueador da bomba de prótons que reduz a produção de ácido e conseqüentemente o pH estomacal, empregado no tratamento de esofagite e refluxo gastroesofágico (GRADY *et al.*, 2019). Conseqüentemente esse voluntário já apresentava histórico de pirose e o evento reportado foi classificado com provável em associação ao uso da solução oral de *M. laevigata*, mesmo não existindo relatos prévios em literatura para este evento.

Os demais eventos foram classificados como leves uma vez que em todos os casos foram facilmente tolerados e não limitaram as atividades diárias dos voluntários. Já com relação à causalidade, tendo em vista o previamente discutido para a espécie *M. glomerata*, apenas os relatos de taquicardia e diarreia poderiam ser associados ao uso do medicamento como atribuído ou provável, devido a apresentarem descrição em literatura publicada.

Logo, embora os dados apresentados no QUADRO 9 demonstrem uma relação de temporalidade com o uso da medicação para o evento de dor de cabeça, este foi classificado como possível de associação ao uso da solução oral devido a não existirem relatos prévios que relacionem o evento ao uso da espécie e a existência de eventos alternativos que podem explicar o efeito observado. Os demais eventos relatados por carecerem de relatos prévios, bem como não terem apresentado uma melhora na redução dos eventos nas semanas sem o uso da medicação (T0 e T3), foram considerados como não atribuíveis ao uso da medicação de solução oral de *M. laevigata*.

Na TABELA 12 estão compilados os resultados obtidos para as medições de pressão arterial e análises do sangue dos voluntários ao longo do estudo para a solução oral de *M. laevigata*. Os mesmos critérios já apresentados e discutidos para a espécie *M. glomerata* foram também utilizados na avaliação destes dados. Assim, a influência do tempo em relação aos resultados foi avaliada através do valor de *p* obtido no teste estatístico para se determinar se a utilização da solução oral de guaco exerceu algum efeito negativo e por conseqüência apresentou algum efeito tóxico para os sistemas hematopoiético, endócrino, hepático, renal e cardiovascular.

TABELA 12 – RESULTADOS CLÍNICOS SOLUÇÃO ORAL DE *M. laevigata*

PARÂMETRO	T0**	T1**	T2**	T3**	REFERÊNCIA	QIC	X ²	GL	p
Eritrócitos (milhões/ μ L)	4,84 \pm 0,49	4,68 \pm 0,56	4,72 \pm 0,5	4,74 \pm 0,55	4,0 a 6,1 ^a	9,261 ^e	9,058	3	0,029*
Hemoglobina (g/dL)	14,35 \pm 1,04	13,93 \pm 1,02	13,91 \pm 1,01	14,04 \pm 1,14	11,8 a 17,7 ^a	8,493 ^e	10,356	3	0,016*
Hematócrito (mL/dL)	42,08 \pm 3,1	41,08 \pm 3,13	40,93 \pm 2,82	41,54 \pm 3,45	35,0 a 52,0 ^a	8,51 ^e	14,865	3	0,002*
Leucócitos (un/ μ L)	5.678,95 \pm 1.273,04	5.973,68 \pm 1374,3	5.757,89 \pm 1544,64	5.847,37 \pm 1458,45	3.840,0 a 10.900,0 ^a	12,961 ^e	3,677	3	0,298
Basófilos (%)	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 a 2 ^a	-	-	-	-
Eosinófilos (%)	1,68 \pm 1,7	1,79 \pm 1,78	1,79 \pm 1,36	1,68 \pm 1,6	0 a 13 ^a	135,071 ^g	0,711	3	0,871
Neutrófilos segmentado (%)	56,84 \pm 7,38	56,74 \pm 8,3	56,32 \pm 7,94	54,74 \pm 7,79	35 a 70 ^a	8,984 ^e	9,935	3	0,019*
Linfócitos (%)	33,16 \pm 6,26	33,84 \pm 6,78	34,26 \pm 7,37	35,11 \pm 7	19 a 49 ^a	11,047 ^e	7,606	3	0,055
Monócitos (%)	7,32 \pm 1,53	6,95 \pm 1,39	6,63 \pm 1,57	7,47 \pm 1,65	3 a 12 ^a	11,516 ^e	13,419	3	0,004*
Plaquetas (un/ μ L)	272.684,21 \pm 50.961,92	271.473,68 \pm 45.795,89	274.157,89 \pm 47.286,67	278.789,47 \pm 55.509,34	163.000,00 a 421.000,00 ^a	10,604 ^e	1,933	3	0,587
Tempo de protrombina (s)	11,05 \pm 0,28	11,05 \pm 0,27	10,92 \pm 0,06	11,06 \pm 0,32	9,3 a 13 ^b	8,242 ^e	8,594	3	0,035*
RNI	1,01 \pm 0,02	1 \pm 0	1 \pm 0	1,01 \pm 0,03	0,8 a 1,2 ^b	-	-	-	-
Tempo de tromboplastina (s)	33,99 \pm 2,87	32,05 \pm 2,1	32,26 \pm 2,49	32,15 \pm 3,05	25 a 35 ^b	8,795 ^e	24,210	3	0,000*
Glicose de jejum (mg/dL)	84,47 \pm 11,81	81,74 \pm 10,08	80,95 \pm 12,1	80,21 \pm 15,45	70 a 100 ^c	10,973 ^e	5,127	3	0,163
Albumina (g/dL)	4,52 \pm 0,19	4,39 \pm 0,28	4,39 \pm 0,23	4,42 \pm 0,19	3,5 a 5,5 ^c	8,306 ^e	9,060	3	0,029*
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,11 \pm 0,05	0,11 \pm 0,06	0,11 \pm 0,04	0,12 \pm 0,07	0,0 a 0,3 ^b	8,209 ^f	6,314	3	0,097
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,48 \pm 0,17	0,47 \pm 0,26	0,49 \pm 0,2	0,52 \pm 0,29	< 0,9 ^b	11,96 ^f	1,104	3	0,776
Bilirrubina total (mg/dL)	0,59 \pm 0,21	0,57 \pm 0,31	0,60 \pm 0,24	0,64 \pm 0,36	0,3 a 1,2 ^b	13,854 ^f	1,449	3	0,694
Triglicérides (mg/dL)	114,79 \pm 58,91	114,11 \pm 64,18	106,47 \pm 45,9	101,68 \pm 52,44	<150,0 ^c	27,704 ^e	8,505	3	0,037*
Colesterol total (mg/dL)	183,32 \pm 38,05	175,16 \pm 27,66	181,32 \pm 29,28	176,26 \pm 29,71	< 200,0 ^c	10,478 ^e	6,020	3	0,111
Fosfatase alcalina (U/L)	63,05 \pm 17,79	57,21 \pm 16,02	60,05 \pm 16,46	59,53 \pm 16,37	30,0 a 120,0 ^c	13,661 ^e	36,754	3	0,000*
GGT (U/L)	21,84 \pm 9,82	20,74 \pm 9,77	21,26 \pm 10,48	21,05 \pm 9,65	8,0 a 50,0 ^c	23,585 ^e	15,628	3	0,001*
ALT (U/L)	20,58 \pm 10,72	18,89 \pm 6,49	19,74 \pm 5,09	17,11 \pm 2,6	10,0 a 40,0 ^c	17,327 ^e	7,630	3	0,054
AST (U/L)	19,32 \pm 10,46	16,58 \pm 7,47	17,68 \pm 6,76	16,79 \pm 9,29	10,0 a 40,0 ^c	23,899 ^e	3,131	3	0,372
Proteínas totais (g/dL)	7,28 \pm 0,38	6,95 \pm 0,59	6,91 \pm 0,44	7,1 \pm 0,33	5,5 a 9,0 ^c	8,289 ^e	22,885	3	0,000*
Ureia (mg/dL)	31,84 \pm 8,43	29,32 \pm 6,82	28,21 \pm 6,43	30,42 \pm 8,2	13,0 a 43,0 ^c	12,084 ^e	18,006	3	0,000*
Creatinina (mg/dL)	0,86 \pm 0,19	0,82 \pm 0,16	0,81 \pm 0,17	0,83 \pm 0,16	0,5 a 1,3 ^c	10,119 ^f	5,322	3	0,150
Potássio (mEq/L)	4,92 \pm 0,31	4,76 \pm 0,31	4,79 \pm 0,27	4,81 \pm 0,26	3,5 a 5,0 ^c	8,355 ^e	8,883	3	0,031*
Sódio (mEq/L)	139,11 \pm 1,88	137,89 \pm 1,85	138,47 \pm 1,26	139,42 \pm 2,17	136,0 a 145,0 ^c	1,901 ^h	32,371	3	0,000*
Pressão diastólica (mmHg)	82,47 \pm 7,19	81,16 \pm 5,98	81,74 \pm 6,01	80,63 \pm 7,51	< 85,0 ^d	8,692 ^e	1,885	3	0,597
Pressão sistólica (mmHg)	124,89 \pm 15,39	119,16 \pm 14,98	121,16 \pm 13,91	117,68 \pm 15,84	< 135,0 ^d	9,243 ^e	11,100	3	0,011*
Histamina (μ g/dL)	0,05 \pm 0,02	-	0,05 \pm 0,02	-	-	4,016 ^f	0,701	1	0,403

NOTA: * p valor estatisticamente significativo com 95% de confiança; ** Valor da $\bar{x} \pm \sigma$; ^a Referência Valdati e colaboradores (2011); ^b Referência MSD (2018); ^c Referência ABIM (2022); ^d Referência Gus (2005); ^e Referência Gus (2005); ^f Distribuição gamma; ^g Distribuição normal; ^h Distribuição tweedie; ⁱ Distribuição Poisson.

Mais uma vez, os resultados dos voluntários da pesquisa para os parâmetros percentual de basófilos e razão normalizada internacional (RNI) para o tempo de ativação da protrombina foram os mesmos ao longo de todos os tempos da pesquisa, dessa forma não foi conduzida a análise estatística desses parâmetros.

Considerando que os parâmetros avaliados para fins de determinação da segurança nas duas espécies de guaco foram os mesmos, as distribuições que melhor descreveram os dados para cada um dos parâmetros avaliados através de GEE foram as mesmas das previamente reportadas para a espécie *M. glomerata*, conforme letras sobrescritas em cada um dos valores de QIC da tabela.

Para 16 dos 32 dos parâmetros monitorados, o teste estatístico resultou em um valor de $p < 0,05$, significando que os resultados desses parâmetros sofreram influência com o tempo do estudo. Para os demais parâmetros não houve evidência estatisticamente significativa de uma influência do tempo sobre a variação do parâmetro e conseqüentemente de um eventual efeito da utilização da solução oral de *M. laevigata* sobre o parâmetro.

O parâmetro histamina, avaliado para investigar uma eventual modulação da medicação sobre este mediador químico do processo inflamatório, não foi apontado pelo teste estatístico como tendo sofrido influência do tempo na sua variação. Para confirmar esse resultado foi realizado o Teste *t* entre as médias do T0 e T2, sendo encontrado o valor de $p = 0,426$, confirmando que os resultados não são estatisticamente diferentes com 95% de confiança. Na posologia avaliada, o resultado obtido não indica a possibilidade de um efeito anti-inflamatório para a *M. laevigata* como sendo resultado da inibição sobre a liberação de histamina na corrente sanguínea.

Em todos os sistemas monitorados foram encontrados parâmetros que sofreram efeito do tempo sobre o seu resultado. Assim a dimensão desses efeitos foi avaliada através da comparação de cada semana de estudo em relação ao T0 para se confirmar uma eventual correlação da utilização da medicação à alteração no parâmetro, os resultados dessa avaliação estão tabulados na TABELA 13.

TABELA 13 – DETALHAMENTO SOBRE OS PARÂMETROS CLÍNICOS QUE SOFRERAM EFEITO DO TEMPO – *M. laevigata*

PARÂMETRO	T	$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$	IC – 95%		β (IC – 95%)	p
			BAIXO	ALTO		
Eritrócitos (milhões/ μ L)	0	4,837 \pm 0,109	4,628	5,056	N.A.	N.A.
	1	4,683 \pm 0,126	4,444	4,936	-0,032 (-0,054 a -0,010)	0,004*
	2	4,721 \pm 0,111	4,508	4,945	-0,024 (-0,042 a -0,007)	0,006*
	3	4,745 \pm 0,123	4,510	4,992	-0,019 (-0,035 a -0,003)	0,018*
Hemoglobina (g/dL)	0	14,347 \pm 0,232	13,900	14,810	N.A.	N.A.
	1	13,932 \pm 0,227	13,494	14,383	-0,029 (-0,052 a -0,007)	0,010*
	2	13,905 \pm 0,226	13,470	14,355	-0,031 (-0,051 a -0,012)	0,002*
	3	14,042 \pm 0,254	13,554	14,548	-0,022 (-0,041 a -0,002)	0,030*
Hematócrito (mL/dL)	0	42,084 \pm 0,692	40,749	43,463	N.A.	N.A.
	1	41,084 \pm 0,698	39,738	42,476	-0,024 (-0,047 a -0,001)	0,044*
	2	40,932 \pm 0,630	39,716	42,185	-0,028 (-0,044 a -0,011)	0,001*
	3	41,537 \pm 0,771	40,054	43,075	-0,013 (-0,031 a 0,005)	0,162
Neutrófilos segmentados (%)	0	56,842 \pm 1,648	53,702	60,166	N.A.	N.A.
	1	56,737 \pm 1,853	53,219	60,488	-0,002 (-0,041 a 0,037)	0,926
	2	56,316 \pm 1,774	52,944	59,902	-0,009 (-0,03 a 0,011)	0,370
	3	54,737 \pm 1,741	51,430	58,257	-0,038 (-0,063 a -0,013)	0,003*
Monócitos (%)	0	7,316 \pm 0,342	6,676	8,017	N.A.	N.A.
	1	6,947 \pm 0,311	6,364	7,585	-0,052 (-0,143 a 0,040)	0,269
	2	6,632 \pm 0,351	5,979	7,356	-0,098 (-0,195 a -0,001)	0,047*
	3	7,474 \pm 0,367	6,787	8,230	0,021 (-0,065 a 0,108)	0,628
Tempo de atividade de protrombina (s)	0	11,053 \pm 0,063	10,930	11,177	N.A.	N.A.
	1	11,047 \pm 0,059	10,932	11,164	0,000 (-0,009 a 0,008)	0,913
	2	10,921 \pm 0,014	10,894	10,949	-0,012 (-0,022 a -0,002)	0,025*
	3	11,058 \pm 0,072	10,917	11,201	0,000 (-0,013 a 0,014)	0,944
Tempo de tromboplastina parcial ativada (s)	0	33,990 \pm 0,640	32,758	35,268	N.A.	N.A.
	1	32,047 \pm 0,470	31,140	32,981	-0,059 (-0,083 a -0,035)	0,000*
	2	32,263 \pm 0,557	31,191	33,373	-0,052 (-0,083 a -0,021)	0,001*
	3	32,147 \pm 0,681	30,841	33,509	-0,056 (-0,093 a -0,018)	0,004*
Albumina (g/dL)	0	4,516 \pm 0,042	4,435	4,598	N.A.	N.A.
	1	4,390 \pm 0,062	4,269	4,513	-0,028 (-0,052 a -0,005)	0,019*
	2	4,395 \pm 0,052	4,293	4,499	-0,027 (-0,048 a -0,007)	0,009*
	3	4,416 \pm 0,042	4,335	4,498	-0,022 (-0,038 a -0,007)	0,005*
Triglicerídeos (mg/dL)	0	114,790 \pm 13,15	91,699	143,695	N.A.	N.A.
	1	114,105 \pm 14,33	89,205	145,956	-0,006 (-0,151 a 0,139)	0,936
	2	106,474 \pm 10,25	88,165	128,584	-0,075 (-0,167 a 0,017)	0,110
	3	101,684 \pm 11,71	81,141	127,429	-0,121 (-0,228 a -0,014)	0,027*
Fosfatase alcalina (U/L)	0	63,053 \pm 3,973	55,728	71,340	N.A.	N.A.
	1	57,211 \pm 3,576	50,614	64,667	-0,097 (-0,139 a -0,056)	0,000*
	2	60,053 \pm 3,676	53,264	67,706	-0,049 (-0,067 a -0,031)	0,000*
	3	59,526 \pm 3,655	52,777	67,139	-0,058 (-0,098 a -0,017)	0,006*
GGT (U/L)	0	21,842 \pm 2,193	17,940	26,593	N.A.	N.A.
	1	20,737 \pm 2,181	16,874	25,485	-0,052 (-0,081 a -0,023)	0,000*
	2	21,263 \pm 2,339	17,139	26,380	-0,027 (-0,085 a 0,031)	0,367
	3	21,053 \pm 2,155	17,225	25,731	-0,037 (-0,093 a 0,019)	0,197
Proteínas totais (g/dL)	0	7,284 \pm 0,085	7,119	7,453	N.A.	N.A.
	1	6,953 \pm 0,132	6,699	7,216	-0,047 (-0,076 a -0,018)	0,002*
	2	6,905 \pm 0,098	6,716	7,100	-0,053 (-0,076 a -0,031)	0,000*
	3	7,100 \pm 0,074	6,956	7,247	-0,026 (-0,043 a -0,008)	0,003*
Ureia (mg/dL)	0	31,842 \pm 1,882	28,359	35,753	N.A.	N.A.
	1	29,316 \pm 1,524	26,477	32,460	-0,083 (-0,167 a 0,001)	0,054
	2	28,211 \pm 1,435	25,534	31,168	-0,121 (-0,179 a -0,063)	0,000*
	3	30,421 \pm 1,831	27,036	34,231	-0,046 (-0,122 a 0,031)	0,242

(continua)

TABELA 13 – DETALHAMENTO SOBRE OS PARÂMETROS CLÍNICOS QUE SOFRERAM EFEITO DO TEMPO – *M. laevigata*

PARÂMETRO	T	$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$	IC – 95%		β (IC – 95%)	<i>p</i>
			BAIXO	ALTO		
Potássio (mEq/L)	0	4,921 ± 0,069	4,788	5,058	N.A.	N.A.
	1	4,758 ± 0,068	4,626	4,894	-0,034 (-0,061 a -0,006)	0,017*
	2	4,790 ± 0,061	4,672	4,910	-0,027 (-0,048 a -0,006)	0,010*
	3	4,811 ± 0,058	4,698	4,926	-0,023 (-0,050 a 0,005)	0,106
Sódio (mEq/L)	0	139,105 ± 0,42	138,284	139,932	N.A.	N.A.
	1	137,895 ± 0,414	137,086	138,708	-0,009 (-0,015 a -0,003)	0,003*
	2	138,474 ± 0,282	137,922	139,028	-0,005 (-0,008 a -0,001)	0,019*
	3	139,421 ± 0,484	138,475	140,373	0,002 (-0,006 a 0,011)	0,602
Pressão sistólica (mmHg)	0	124,895 ± 3,436	118,339	131,814	N.A.	N.A.
	1	119,158 ± 3,344	112,781	125,895	-0,047 (-0,075 a -0,019)	0,001*
	2	121,158 ± 3,106	115,221	127,401	-0,03 (-0,065 a 0,004)	0,084
	3	117,684 ± 3,537	110,952	124,825	-0,059 (-0,106 a -0,013)	0,011*

NOTA: * *p* valor estatisticamente significativo com 95% de confiança

Os dados apresentados na TABELA 13 permitem distinguir os parâmetros em duas categorias principais, aqueles que sofreram influência característica e significativa em relação com o tempo e que, conseqüentemente, podem ser correlacionados com o uso da medicação e aumento na sua dose, aqueles que sofreram influência do tempo de forma inespecífica e, dessa forma, que não podem ser correlacionados ao uso da medicação e aumento da sua dose. Nessa última categoria foram considerados os parâmetros de contagem dos neutrófilos segmentados, dosagem de triglicerídeos, GGT e pressão arterial sistólica.

Para os dois primeiros parâmetros citados, é possível observar que os valores de *p* que apresentaram significância estatística para a diferença média dos resultados estão localizados no T3, quando já havia sido suspenso por uma semana a medicação, além disso, o teste de Sidak apresenta para os neutrófilos segmentados apenas os pares T0/T3 e T2/T3 com médias estatisticamente diferente, *p* = 0,015 e *p* = 0,045 respectivamente. Já para o parâmetro dos triglicerídeos, o teste *post hoc* não apresentou nenhum par de tempos avaliados com diferença nas médias estatisticamente significativa.

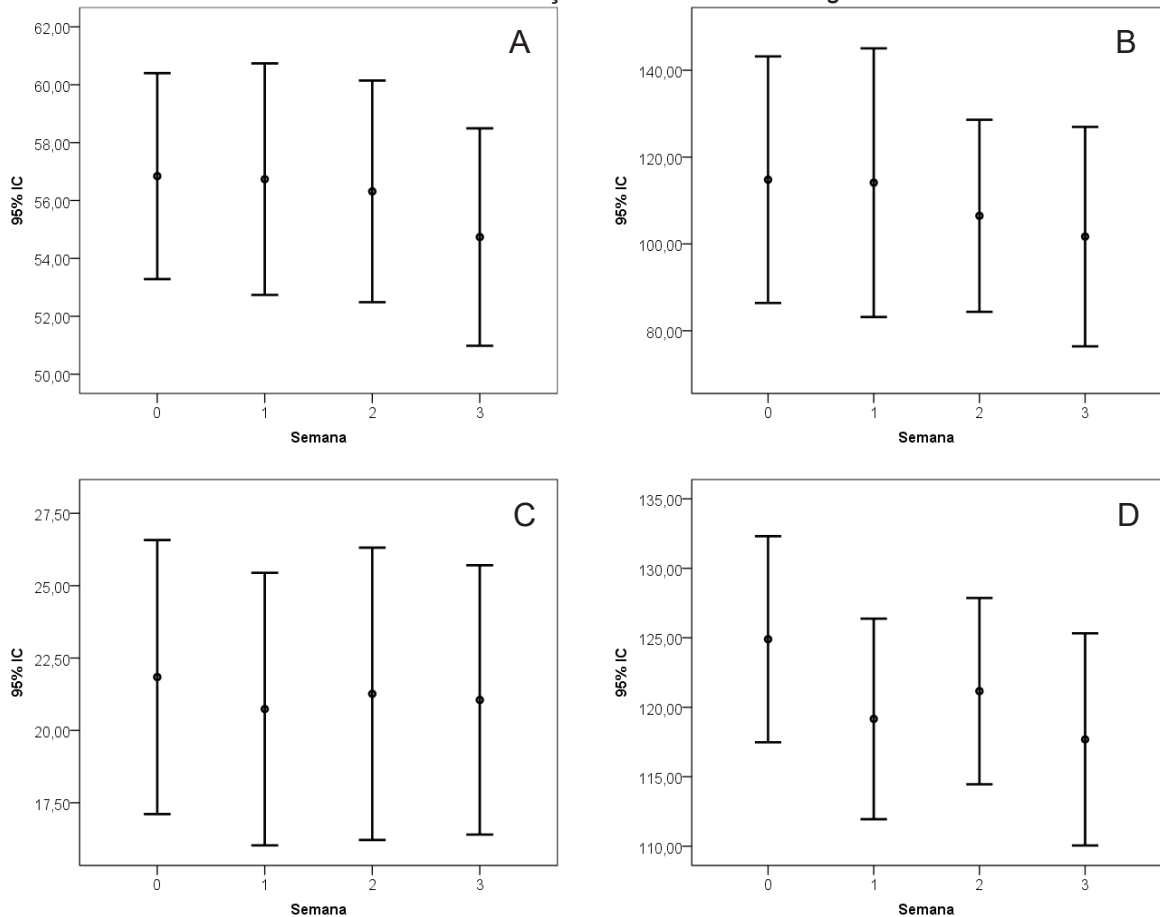
Já o parâmetro GGT apresentou significância estatística apenas para β de T1 quando comprado ao T0, não ocorrendo alterações significativas no parâmetro com o aumento da dose em T2. Igualmente, o teste de Sidak apresentou significância para as diferenças nas médias apenas do par T0/T1, com *p* = 0,000.

Finalmente, para o parâmetro de pressão arterial sistólica, a variação apontada pelo teste estatístico também foi considerada não correlacionada ao uso da

medicação considerando que a significância apontada pelo GEE foi circunscrita ao T1 e T3, não envolvendo T2 quando foi atingida a dose máxima diária do medicamento utilizado pelos voluntários. O teste *post hoc* também apresentou diferença estatisticamente significativa entre as médias apenas para o par T0/T1, $p = 0,007$, o que demonstra uma variação não correlacionada ao uso da medicação. Esse último resultado é particularmente importante uma vez que, associado à ausência de significância estatística para a variação da pressão arterial diastólica, descarta um efeito da utilização da solução oral da espécie *M. laevigata* sobre a pressão arterial dos voluntários, o que comprova a segurança da espécie para esse parâmetro.

A FIGURA 29 apresenta os gráficos de barra de erro das médias e seus respectivos IC – 95% em cada tempo para os parâmetros anteriormente discutidos. A visualização dos gráficos auxilia na confirmação da ausência de correlação do uso da solução oral de *M. laevigata* à variação dos resultados desses parâmetros.

FIGURA 29 – GRÁFICOS DE BARRA DE ERRO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS SEM EFEITO ASSOCIADO À SOLUÇÃO ORAL DE *M. laevigata*



LEGENDA: A – Neutrófilos segmentados (%); B – Triglicerídeos (mg/dL); C – GGT (U/L); D – Pressão sistólica (mmHg).

Já para os demais parâmetros da TABELA 13, conforme já descrito, foi considerado como correlacionado ao uso da medicação a variação nos resultados observados ao longo do tempo do estudo.

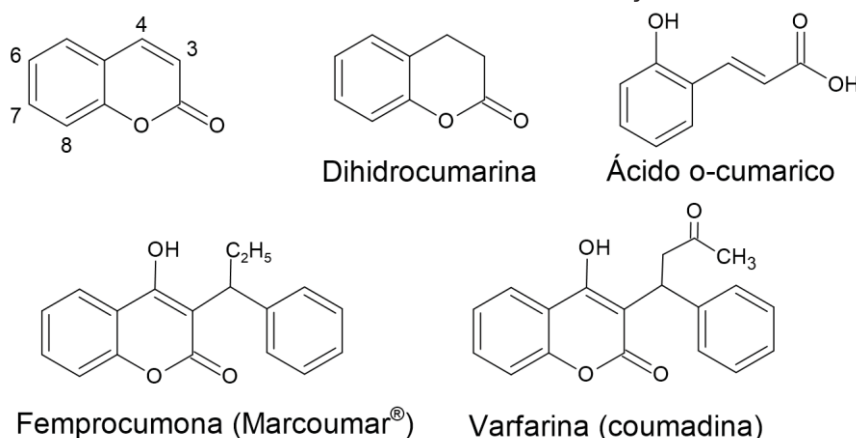
Primeiramente, para os três parâmetros da série do eritograma – eritrócitos, hemoglobina e hematócrito – os dois tempos avaliados durante o uso da medicação, T1 e T2, foram indicados como apresentando diferença média estatisticamente diferente ao T0 com 95% de confiança. Sendo que, essa diferença média foi reduzida no T3, com a suspensão do uso da medicação, o que no parâmetro do hematócrito levou esse tempo a deixar de apresentar diferença com significância estatística ao T0. Para os dois últimos parâmetros o teste *post hoc* aplicado evidenciou um valor de p significativo apenas para as médias do par T0/T2, $p = 0,009$ e $p = 0,007$ respectivamente para hemoglobina e hematócrito. Já para os eritrócitos, a significância estatística foi apontada para as médias dos pares T0/T3 e T2/T3, $p = 0,015$ e $p = 0,045$ respectivamente. Esses resultados sugerem um efeito do uso da espécie *M. laevigata* sobre as células vermelhas do sangue, entretanto, apenas para o parâmetro eritrócitos um dos voluntários sofreu alteração com dois resultados ligeiramente maiores do que o limite máximo aceitável para o parâmetro no T1 e T3, 6,12 e 6,20 milhões/ μ L respectivamente. Os demais resultados não variaram para além dos limites aceitáveis para indivíduos saudáveis.

Com relação aos monócitos, foi observada um claro aumento na diferença média dos resultados dos tempos T1 e T2 em relação ao T0 com redução do valor de β após a interrupção do uso do medicamento. Embora o GEE tenha apontado o T2 com diferença significativa em relação ao T0, o teste de Sidak identificou diferença apenas o par T2/T3, $p = 0,022$. Mais uma vez não foram encontrados resultados dos voluntários para além dos valores de referência.

Para os dois parâmetros de coagulação sinalizados como tendo sofrido influência do tempo sobre seus resultados, os dados apresentados na TABELA 13 são particularmente importantes. Embora Leite e colaboradores (2019) tenham publicado em seu trabalho resultado indicando ação anticoagulante do extrato de *M. laevigata* sobre as vias intrínseca e extrínseca de coagulação do sangue, através de avaliação *in vitro* dos tempos de atividade de protrombina e tempo de tromboplastina, os resultados do presente trabalho demonstram que a ação não é a mesma da observada *in vitro* quando o medicamento é avaliado em humanos.

Em um estudo sobre o efeito anticoagulante do extrato de *Pelagonium sidoides* DC, espécie vegetal rica em cumarinas hidroxiladas e metoxiladas, como escopoletina e uncalina, os autores discutem que para que as cumarinas apresentem ação anticoagulante é necessária a presença de um grupo hidroxila e um grupo não polar respectivamente nas posições quatro e três da estrutura geral dessas moléculas, como o observado nas cumarinas varfarina e femprocumona, FIGURA 30. Cumarinas que não apresentem na sua estrutura química os grupamentos indicados nas posições sinalizadas não possuiriam ação anticoagulante. Portanto, concluem os autores do estudo que, como as estruturas químicas das cumarinas de *P. sidoides* não possuem essas características, não haveria a possibilidade do extrato dessa espécie influenciar nos fatores de coagulação do sangue humano (KOCH; BIBER, 2007).

FIGURA 30 – ESTRUTURA QUÍMICA DA CUMARINA E AÇÃO ANTICOAGULANTE



FONTE: O autor (2022)

NOTA: Derivados do ácido cinâmico presentes no guaco – cumarina, dihidrocoumarina e ácido o-cumárico; Cumarinas com ação anticoagulante – femprocumona e varfarina.

Logo, como as cumarinas presentes nas duas espécies de guaco, e em maior concentração especialmente em *M. laevigata*, não apresentam na sua estrutura os grupos químicos nas posições citadas no parágrafo anterior, os resultados observados no presente estudo para a ação anticoagulante da solução oral corroboram com a literatura publicada.

Conforme os dados obtidos, para os dois fatores de coagulação houve significância estatística na diferença média do T2 em relação ao T0, sendo que para o tempo de tromboplastina também foram identificadas diferenças para T1 e T3. Entretanto, as médias observadas para os tempos de ativação dos fatores, nos dois tempos durante a utilização da medicação, são inferiores ao T0, o que não sugere um

efeito anticoagulante da espécie, mas sim segurança em relação a esse parâmetro. Com relação ao teste *post hoc*, para protrombina não houve diferença significativa para as médias dos pares dos tempos do estudo, já para o tempo de tromboplastina os valores de p foram significativos, $p < 0,000$, $p = 0,007$ e $p = 0,021$ para os pares T0/T1, T0/T2 e T0/T3 respectivamente.

O resultado demonstra a importância da condução de estudos clínicos para confirmar ou refutar a extrapolação de resultados encontrados em estudos *in vitro* ou *in vivo* para o organismo humano e, conseqüentemente, garantir a segurança e eficácia da utilização de fitoterápicos pela população.

Nos três parâmetros monitorados para a função hepática e sinalizados sofrendo efeito do tempo, albumina, fosfatase alcalina e proteínas totais, os resultados da diferença média dos tempos T1 e T2 foram estatisticamente diferentes em relação ao T0, com a média do T3 tendendo a retornar a se aproximar do valor de T0, embora a diferença média entre esses dois tempos, nos três parâmetros, ainda tenha apresentado significância estatística. As alterações nesses três parâmetros associados sugerem uma interferência do medicamento na função hepática, embora não tenham sido encontrados resultados para nenhum dos voluntários fora da referência definida para indivíduos saudáveis. Entretanto, é importante ressaltar que outros parâmetros relacionados à função hepática, ALT, AST e bilirrubina total, não sofreram alteração associada ao uso da medicação, o que caracteriza o medicamento como seguro para este órgão alvo.

Finalmente, os três parâmetros monitorados mais associados à função renal, ureia, potássio e sódio, apresentaram significância estatística de β do T2 em relação ao T0. Nos três casos ocorreu redução dos valores médios durante a utilização da medicação por parte dos voluntários, conforme dados de T1 e T2, com tendência de retorno da média dos resultados para próximo do T0 com a suspensão do uso da medicação o que é evidenciado pela ausência de significância estatística na diferença média em T3.

A redução dos níveis de ureia no sangue possuem menor relevância clínica isoladamente, uma vez que a redução dos níveis séricos da ureia está associada à maior eliminação renal ou à menor produção da molécula pelo fígado (WILLIAMSON; SNYDER, 2015). Portanto, o resultado pode ser associado aos demais parâmetros hepáticos discutidos anteriormente corroborando para um indicativo que sugere interferência do medicamento no metabolismo hepático. Entretanto, esses resultados

associados não suportam a afirmação de que pacientes com problemas hepáticos podem apresentar toxicidade com o uso prolongado de *M. laevigata* (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Isso porque, apenas para o parâmetro ureia um voluntário apresentou resultado em T2, 12 mg/dL, ligeiramente abaixo do limite mínimo aceitável para o parâmetro.

Embora a aplicação do GEE tenha resultado em significância estatística para o fator β de T1 e T2 em relação ao T0 nos parâmetros potássio e sódio, as médias dos resultados nos tempos T1 e T2 não demonstraram uma relação dose dependente com o uso do medicamento. Essa afirmação é corroborada pelo teste *post hoc* que para potássio não demonstrou significância estatística na comparação dos pares de médias dos tempos do estudo, enquanto para os valores de sódio apresentou $p = 0,019$ e $p = 0,002$ apenas para os pares de média T0/T1 e T1/T3 respectivamente. Em nenhum dos parâmetros foi encontrada diferença estatisticamente significativa na média do resultado do T2, semana com maior ingestão da solução oral, em relação as outras semanas do estudo.

Além disso, para o parâmetro potássio, os voluntários que apresentaram resultados fora da faixa de referência para indivíduos saudáveis, já apresentavam esses valores no T0, ou seja, sem a utilização da medicação. Já para o sódio foram apenas dois resultados abaixo da faixa de referência para indivíduos saudáveis, ambos de 135 mEq/L. Assim, mesmo que as variações observadas nesses dois parâmetros tenham sido correlacionadas ao uso da medicação, as modificações foram consideradas de menor impacto e não indicam toxicidade da solução oral de *M. laevigata* para os rins.

A FIGURA 31 apresenta os gráficos de barra de erro das médias e seus respectivos IC – 95% em cada tempo para os parâmetros acima discutidos, eles auxiliam na confirmação da correlação do uso da solução oral de *M. laevigata* à variação dos resultados desses parâmetros.

FIGURA 31 – GRÁFICOS DE BARRA DE ERRO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS COM EFEITO ASSOCIADO À SOLUÇÃO ORAL DE *M. laevigata*

(continua)

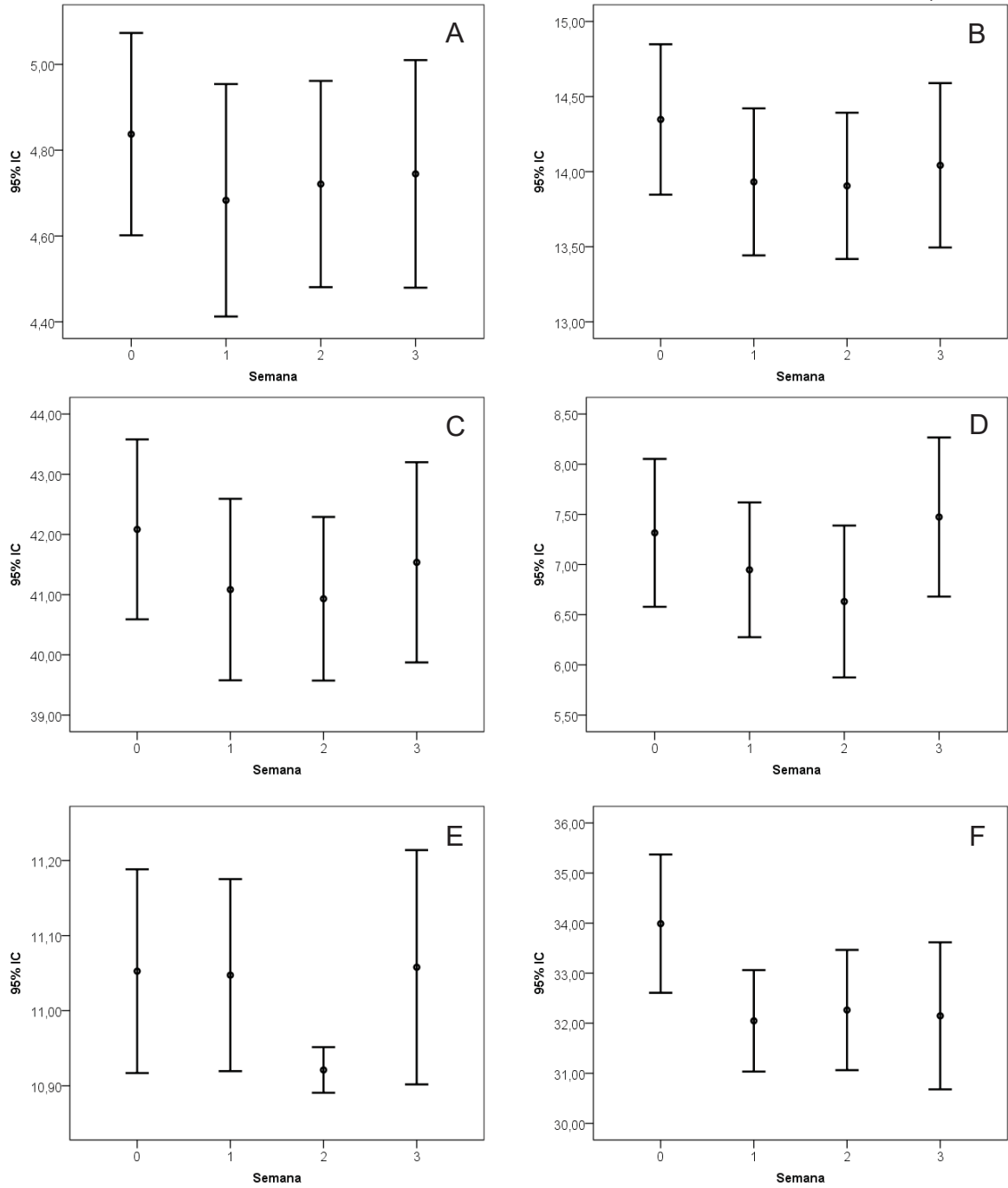
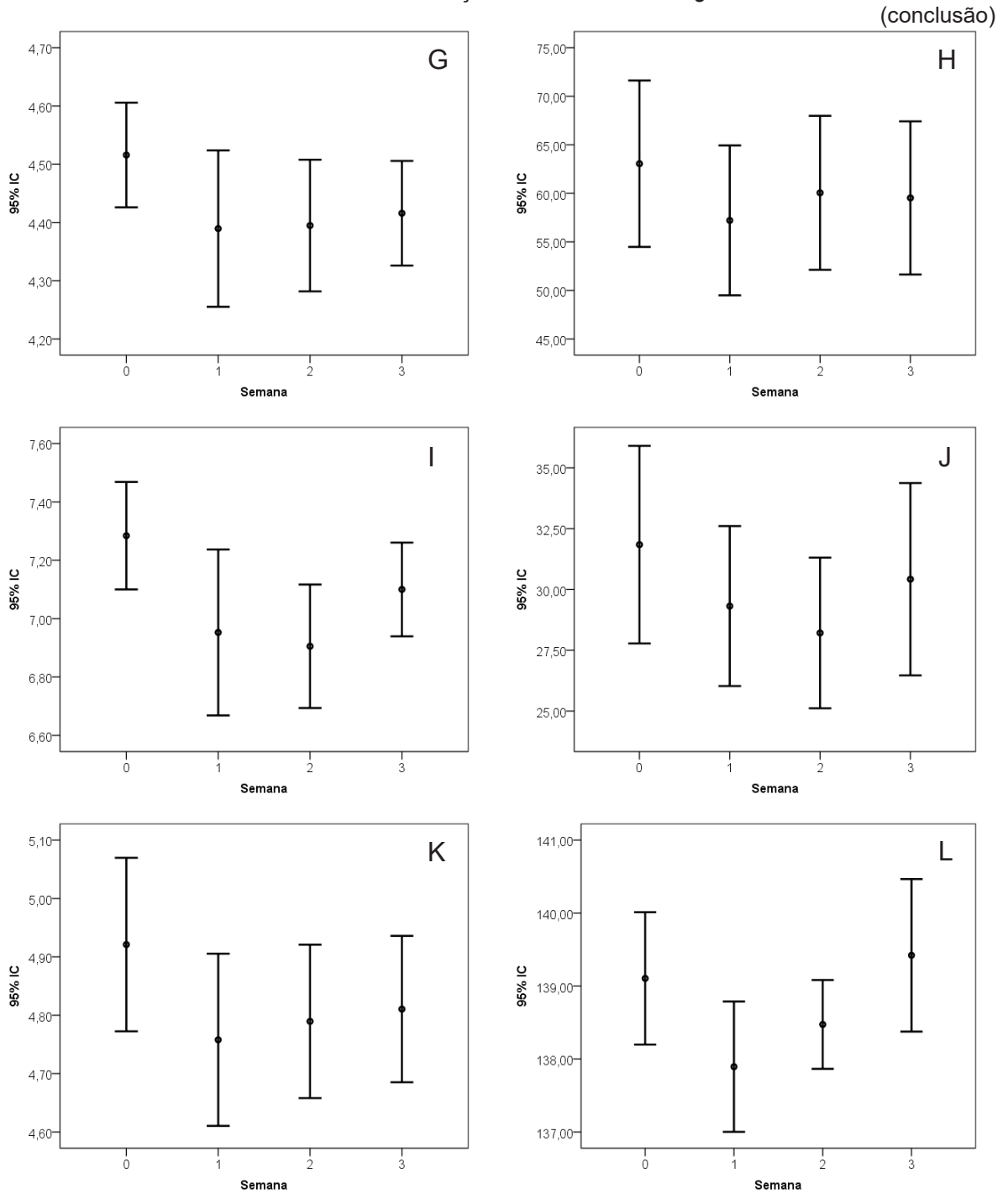


FIGURA 31 – GRÁFICOS DE BARRA DE ERRO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS COM EFEITO ASSOCIADO À SOLUÇÃO ORAL DE *M. laevigata*



LEGENDA: A – Eritrócitos (milhões/ μ L); B – Hemoglobina (g/dL); C – Hematócrito (mL/dL); D – Monócitos (%); E – Tempo de atividade de protrombina (s); F – Tempo de tromboplastina parcial ativada (s); G – Albumina (g/dL); H – Fosfatase alcalina (U/L); I – Proteínas totais (g/dL); J – Ureia (mg/dL); K – Potássio (mEq/L); L – Sódio (mEq/L).

Conforme já discutido, a correlação das variações observadas nos resultados dos parâmetros albumina, fosfatase alcalina, proteínas totais e ureia sugerem que a solução oral *M. laevigata* interfere no metabolismo hepático. Todavia, esse efeito não

pode ser considerado tóxico e/ou negativo para esses parâmetros, uma vez que apenas para o parâmetro ureia os resultados de dois voluntários figuraram fora dos parâmetros de aceitação para indivíduos saudáveis, cada um deles em um tempo da pesquisa, sendo um deles no T0.

Além dos efeitos acima, um evento adverso de pirose relatado foi classificado como provável em associação ao uso da solução oral de *M. laevigata*, embora tenha sido correlacionado ao distúrbio gástrico do qual o voluntário era portador.

Não foram atribuídos outros eventos adversos ao uso da medicação, bem como não foi correlacionado efeito do seu uso aos demais parâmetros monitorados no estudo. Desta forma é possível afirmar sobre a ausência de toxicidade e, conseqüentemente, a segurança da solução oral de *M. laevigata* dentro da posologia administrada e para os parâmetros monitorados no estudo.

Finalmente, considerado que, conforme demonstrado na etapa analítica do trabalho, o grupamento químico majoritário do metabolismo secundário da espécie são os derivados do ácido cinâmico, os resultados acima apresentados estão em concordância com estudos clínicos prévios conduzidos em espécies também ricas nessas moléculas. Como exemplo, estudos clínicos conduzidos com a espécie *P. sidoides* não relataram eventos adversos com relevância, além de reportarem ausência de alterações significativas nos parâmetros de sangue monitorados nos voluntários da pesquisa (CHUCHALIN; BERMAN; LEHMACHER, 2005; KAMIN *et al.*, 2010; MATTHYS *et al.*, 2003, 2010).

6 CONCLUSÃO

As análises cromatográficas das plantas possuindo identificação botânica demonstraram diferença quantitativa significativa entre as espécies *M. glomerata* e *M. laevigata* para os metabólitos secundários avaliados no estudo.

Os resultados obtidos para a cumarina permitem questionar a escolha desta molécula como marcador de controle de qualidade e padronização química da espécie *M. glomerata*.

Os modelos quimiométricos desenvolvidos com os espectros de IV-médio e IV-próximo, ambos guiados pelas análises cromatográficas, foram capazes de corretamente classificar as amostras pertencentes a cada uma das espécies de guaco sendo, portanto, uma alternativa para a identificação inequívoca das espécies estudadas.

O estudo clínico foi conduzido com medicamentos quimicamente padronizados e que reproduziram o que foi obtido na análise da droga vegetal, uma diferença significativa na composição química entre as duas espécies de guaco.

A baixa concentração de cumarina em *M. glomerata* não permitiu que no estudo clínico da espécie fosse atendida a posologia definida pela ANVISA para esse marcador. Já com a medicação de *M. laevigata* foi possível atender e exceder a posologia para essa molécula. Esses resultados sugerem que a cumarina é viável para definição de posologia para uso humano de medicamentos da espécie *M. laevigata*, entretanto não é o marcador adequado para a mesma definição em medicamentos da espécie *M. glomerata*.

Os resultados clínicos obtidos pela primeira vez comprovaram a ausência de toxicidade, logo a segurança para a utilização das duas espécies vegetais em humanos. Para a espécie *M. glomerata*, diferente do previamente reportado, não foram encontrados efeitos sobre os fatores de coagulação do sangue, o que demonstrou a espécie não ter ação anticoagulante em humanos. Também não foram encontrados efeitos significativos do uso do medicamento sobre os marcadores da função hepática monitorados e pressão arterial. Além disso os eventos adversos reportados pelos voluntários da pesquisa não foram associados ao uso da medicação dessa espécie.

Para a espécie *M. laevigata* de igual forma não foi identificado efeito anticoagulante da espécie no sangue dos voluntários, além da ausência de efeitos

sobre a pressão arterial dos voluntários. Entretanto, foram observados um maior número de efeitos sobre os parâmetros hematopoiéticos e da função hepática monitorados em relação à espécie *M. glomerata*. Os efeitos foram associados ao uso da medicação, entretanto não foram mudanças que levaram a uma alteração significativa nos resultados laboratoriais desses parâmetros em relação aos valores de referência para indivíduos saudáveis.

A histamina monitorada no sangue dos voluntários não sofreu alteração ao longo do estudo para nenhuma das espécies. Esse resultado não indica uma ação anti-inflamatória do guaco através da inibição sistêmica deste mediador químico da inflamação.

Os resultados da caracterização química das espécies associado aos resultados clínicos de segurança permitem questionar a intercambialidade do uso atualmente aceito entre *M. glomerata* e *M. laevigata*.

Finalmente, como perspectiva futura para novos estudos, um dos voluntários da pesquisa fez o seguinte relato por escrito no questionário para avaliação clínica do voluntário: “Gostaria de relatar que com o xarope utilizado na primeira etapa da pesquisa, em especial com a dose de 15 mL, percebi, uma melhora em minha capacidade respiratória, reduzindo o uso de salbutamol. O mesmo não ocorreu com o xarope da segunda etapa”. Esse voluntário é portador de asma e faz uso diário de corticoide para controle da inflamação das vias aéreas, associado ao salbutamol como medicação de resgate para os episódios diários de falta de ar, ele recebeu solução oral de *M. laevigata* na primeira etapa do estudo. Portanto, estudos adicionais são necessários para demonstrar a eficácia de cada uma das espécies de guaco, de forma a que seja definido para a população qual das duas espécies deve ser efetivamente utilizada como um medicamento fitoterápico.

REFERÊNCIAS

- ABIM - AMERICAM BOARD OF INTERNAL MEDICINE. **Laboratory Test Reference Ranges –January 2022**. Disponível em: <[https://www.abim.org/search?q=Laboratory Test Reference Ranges–January 2022](https://www.abim.org/search?q=Laboratory+Test+Reference+Ranges–January+2022)>. Acesso em: 12 abr. 2022.
- AGOSTINI-COSTA, T. S. *et al.* Effect of accessions and environment conditions on coumarin, o-coumaric and kaurenoic acids levels of *Mikania laevigata*. **Planta Medica**, v. 82, n. 16, p. 1431–1437, 2016.
- AGRANONIK, M. **Equações de estimação generalizadas (GEE): aplicação em estudo sobre mortalidade neonatal em gemelares de Porto Alegre, RS (1995-2007)**. 110 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- ALMEIDA, C. L. *et al.* Effect of seasonality and growth conditions on the content of coumarin, chlorogenic acid and dicaffeoylquinic acids in *Mikania laevigata* Schultz and *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) by UHPLC–MS/MS. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 418, p. 162–172, 2017.
- ALVES, C. F. *et al.* Anti-inflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 8, p. 1097–1104, 2009.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Appendix F: guidelines for standard method performance requirements**, 2016. Disponível em: <http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2022.
- ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E1655 - standard practices for infrared multivariate quantitative analysis**. 2017.
- BALLABIO, D.; CONSONNI, V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models PLS-DA. **Analytical Methods**, v. 5, n. 16, p. 3790–3798, 2013.
- BASTOS, C. L. *et al.* Anatomical and molecular identification of “guaco” *Mikania glomerata* and *Mikania laevigata* (Asteraceae), two important medicinal species from Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 18, p. 4579–4583, 2011.
- BERTOLUCCI, S. K. V. *et al.* Development and validation of an RP-HPLC method for quantification of cinnamic acid derivatives and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Planta Medica**, v. 75, n. 3, p. 280–285, 2009.
- _____. Seasonal variation on the contents of coumarin and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *M. glomerata* leaves under different shade levels. **Chemistry and Biodiversity**, v. 10, n. 2, p. 288–295, 2013a.
- _____. Isolation and HPLC quantitation of kaurane-type diterpenes and cinnamic acid derivatives of long-term stored leaves of *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 2, p. 473–485, 2013b.

BISHT, A. *et al.* Chlorogenic acid potentiates the anti-inflammatory activity of curcumin in LPS-stimulated THP-1 cells. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 1–12, 2020.

BORGHI, A. A.; ALMEIDA, C. L.; SAWAYA, A. C. H. F. Damage and drying modify the composition of *Mikania glomerata* and *Mikania laevigata* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 6, p. 793–797, 2019.

BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of flora medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n. 18, p. 1–8, 2007.

BOUZADA, M. L. M. *et al.* Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 44–52, 2009.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Instrução Normativa nº 02 de 13 de março de 2014. Publica a “lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 90, 14 de maio 2014, 2014a. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/int0002_13_05_2014.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2017.

_____. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 90, 14 de maio 2014, 2014b. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2017.

_____. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 9, de 20 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre o regulamento para a realização de ensaios clínicos com medicamentos no Brasil. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 41, 03 de mar. 2015. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3503972/RDC_09_2015_COMP.pdf>. Acesso em: 04 abr. 2019.

_____. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 141, 25 de jul. 2017. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 05 jun. 2018.

_____. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira VI - Volume 1**. Brasília - DF, 2019.

_____. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Formulário de fitoterápicos farmacopeia brasileira 2a edição**. Brasília - DF, 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos**. Brasília – DF, 2006. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf>. Acesso em: 15 set. 2018.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria GM nº 3.237 de 24 de dezembro de 2007. Aprovar as normas de execução e de financiamento da assistência farmacêutica na atenção básica em saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 de dez. 2007. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2007/prt3237_24_12_2007.html>. Acesso em: 08 de mar. 2018.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Instruções operacionais: Informações necessárias para a condução de ensaios clínicos com fitoterápicos**. Brasília–DF, 2008. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapicos.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2021.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2.982 de 26 de novembro de 2009. Aprova as normas de execução e de financiamento da Assistência Farmacêutica na Atenção Básica. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 228, 30 de nov. 2009. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt2982_26_11_2009_rep.html>. Acesso em: 08 de mar. 2018.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução nº 446 de 11 de agosto de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 166, 29 de ago. 2011. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2011/res0446_11_08_2011.html>. Acesso em: 30 de maio. 2021.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 704 de 8 de março de 2017. Define a lista de produtos estratégicos para o Sistema Único de Saúde (SUS), nos termos dos anexos a esta Portaria. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 de mar. 2017. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prt0704_10_03_2017.html>. Acesso em: 15 nov. 2020. Acesso em: 20 jan. 2021

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informações sistematizadas da relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS : *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae – guaco**. Brasília-DF, 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sctie/daf/componentes-da-assistencia-farmacutica-no-sus/cbaf/arquivos/arquivos-plantas-medicinais-e-fitoterapicos/mikania-glomerata.pdf/view>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação nacional de medicamentos essenciais 2022**. Brasília-DF, 2022. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sctie/daf/20210367-rename-2022_final.pdf> Acesso em: 20 mar. 2022.

BUDEL, J. M. *et al.* 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. 19, n. 2b, p. 545–552, 2009.

CHO, J. H. *et al.* Inhibitory effects of diterpene acids from root of *Aralia cordata* on IgE-mediated asthma in guinea pigs. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 190–199, 2010.

CHOW, S. C.; WANG, H. On sample size calculation in bioequivalence trials. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 28, n. 2, p. 155–169, 2001.

CHUCHALIN, A. G.; BERMAN, B.; LEHMACHER, W. Treatment of acute bronchitis in adults with a *Pelargonium sidoides* preparation (EPs® 7630): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Explore: The Journal of Science and Healing**, v. 1, n. 6, p. 437–445, 2005.

COHEN, A. J. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 17, n. 3, p. 277–289, 1979.

COSTA, R. J. *et al.* In vitro study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 1, p. 86–93, 2008.

COSTA, V. C. D. O. *et al.* Comparison of the morphology, anatomy, and chemical profile of *Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*. **Planta Medica**, v. 84, n. 3, p. 191–200, 2018.

DALLA NORA, G. D. *et al.* Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Biocell**, v. 34, n. 3, p. 95–101, 2010.

DE ALMEIDA, V. P. *et al.* Comparative morphoanatomical analysis of *Mikania* species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 9–19, 2017.

DE 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* and *Mikania laevigata*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 105–110, 2015.

_____. Stability of hydroalcoholic extracts of two species of guaco; *Mikania glomerata* Spreng. and *Mikania laevigata* Schult. (Asteraceae), by UHPLC-MS. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, p. 1–12, 2020.

DELLA PASQUA, C. S. P. *et al.* Pharmacological study of anti-inflammatory activity of aqueous extracts of *Mikania glomerata* (Spreng.) and *Mikania laevigata* (Sch. Bip. ex Baker). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, p. 50–56, 2019.

DOS SANTOS, R. R. *et al.* Evaluation of genotoxicity and coumarin production in conventional and organic cultivation systems of *Mikania glomerata* Spreng. **Journal of Environmental Science and Health - Part B**, v. 54, n. 10, p. 866–874, 2019.

DOS SANTOS, S. C. **Caracterização cromatográfica de extratos medicinais de guaco: *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker e *M. glomerata* Sprengel e ação de *M. laevigata* na inflamação alérgica pulmonar.** 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

DOS SANTOS, S. C. *et al.* LC characterisation of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. **Planta Medica**, v. 72, n. 8, p. 679–684, 2006.

FERREIRA, M. M. C. *et al.* Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724–731, 1999.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - conceitos, métodos e aplicações.** 1. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2015.

FREITAS, T. P. *et al.* Effects of *Mikania glomerata* Spreng. and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae) extracts on pulmonary inflammation and oxidative stress caused by acute coal dust exposure. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 4, p. 761–766, 2008.

FULANETTI, F. B. *et al.* Toxic effects of the administration of *Mikania glomerata* sprengel during the gestational period of hypertensive rats. **Open Veterinary Journal**, v. 6, n. 1, p. 23–29, 2016.

GAD, H. A. *et al.* Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: a review. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 1, p. 1–24, 2013.

GARCIA, C. G. *et al.* Evaluation of the bronchodilator effect of guaco syrup: a randomized, double-blind, crossover clinical trial. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, n. 1, p. 111–117, 2020.

GASPARETTO, J. C. *et al.* *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. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 627–640, 2010.

_____. *Mikania glomerata* and *M. laevigata*: clinical and toxicological advances. In: ACREE, B. **Toxicity and Drug Testing.** 1. ed. Rijeka: InTech, 2012. p. 297–320.

GASPARETTO, J. C. **Avaliação da biodisponibilidade dos principais metabólitos secundários do guaco a partir da forma farmacêutica xarope.** 164 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

GASPARETTO, J. C. *et al.* A kinetic study of the main guaco metabolites using syrup formulation and the identification of an alternative route of coumarin metabolism in humans. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 1–22, 2015. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0118922>>. Acesso em: 30 de ago. 2018.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. Reações de hipersensibilidade. In: _____. **Kuby imunologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, 2002. p. 405–406.

GRAÇA, C. *et al.* In vivo assessment of safety and mechanisms underlying in vitro relaxation induced by *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker in the rat trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 430–439, 2007a.

_____. *Mikania laevigata* syrup does not induce side effects on reproductive system of male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 29–32, 2007b.

GRADY, H. *et al.* Development of dexlansoprazole delayed-release capsules, a dual delayed-release proton pump inhibitor. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 11, p. 3496–3501, 2019.

GUS, M. Que valores devem ser adotados como limites de normalidade na monitorização ambulatorial de pressão arterial e na monitorização residencial de pressão arterial? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n. 3, p. 212–214, 2005.

HOLTMANN, G. *et al.* Efficacy of artichoke leaf extract in the treatment of patients with functional dyspepsia: a six-week placebo-controlled, double-blind, multicentre trial. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 18, n. 11–12, p. 1099–1105, 2003.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 713–722, 1996.

HWANG, S. J. *et al.* Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Inflammation Research**, v. 63, n. 1, p. 81–90, 2014.

ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **General considerations for clinical trials - E8**. 1997. Disponível em: <<https://www.ich.org/page/efficacy-guidelines#8-1>>. Acesso em: 15 fev. 2022.

IKEDA, M. *et al.* A phase 1b study of transforming growth factor-beta receptor I inhibitor galunisertib in combination with sorafenib in Japanese patients with unresectable hepatocellular carcinoma. **Investigational New Drugs**, v. 37, p. 118–126, 2019.

JIN, X. *et al.* Application of visible and near-infrared spectroscopy to classification of *Miscanthus* species. **Plos One**, v. 12, n. 4, p. 1–12, 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0171360>>. Acesso em: 20 de jun. 2019.

KAMIN, W. *et al.* Efficacy and tolerability of EPs 7630 in patients (aged 6-18 years old) with acute bronchitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical dose-finding study. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 99, n. 4, p. 537–543, 2010.

KIRCHHOFF, R. *et al.* Increase in choleresis by means of artichoke extract.

Phytomedicine, v. 1, n. 2, p. 107–115, 1994.

KOCH, E.; BIBER, A. Treatment of rats with the *Pelargonium sidoides* extract EPs® 7630 has no effect on blood coagulation parameters or on the pharmacokinetics of warfarin. **Phytomedicine**, v. 14, supl. 1, p. 40–45, 2007.

KOWALSKI, B. R. Chemometrics: views and propositions. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 15, n. 4, p. 201–203, 1975.

KUMAR, K. *et al.* Classification of aqueous-based ayurvedic preparations using synchronous fluorescence spectroscopy and chemometric techniques. **Current Science**, v. 107, n. 3, p. 470–477, 2014.

LACY, A.; O'KENNEDY, R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 30, p. 3797–3811, 2004.

LEITE, P. M. *et al.* In vitro anticoagulant activity of *Mikania laevigata*: deepening the study of the possible interaction between guaco and anticoagulants. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 74, n. 6, p. 574–583, 2019.

LEITE, P. M.; CAMARGOS, L. M.; CASTILHO, R. O. Recent progress in phytotherapy: a Brazilian perspective. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 41, p. 1–9, 2021.

LEONART, L. P. *et al.* New metabolites of coumarin detected in human urine using ultra performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1–12, 2017.

LI, Y. *et al.* A Comprehensive and comparative study of *Wolfiporia extensa* cultivation regions by fourier transform infrared spectroscopy and ultra-fast liquid chromatography. **Plos One**, v. 11, n. 12, p. 1–18, 2016. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0168998>>. Acesso em: 20 de jun. 2019.

LI, Y. *et al.* Analyzing longitudinal binary data in clinical studies. **Contemporary Clinical Trials**, v. 115, p. 1–7, 2022.

LIANG, K. Y.; ZEGER, S. L. Longitudinal data analysis using generalized linear models. **Biometrika**, v. 73, n. 1, p. 13–22, 1986.

MAIORANO, V. A. *et al.* Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 364–370, 2005.

MALINOWSKI, E. R. **Factor Analysis in Chemistry**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1991.

MARTENS, H. *et al.* Pre-whitening of data by covariance-weighted pre-processing. **Journal of Chemometrics**, v. 17, n. 3, p. 153–165, 2003.

MARTINS, C. A. F. *et al.* Non-targeted electrospray mass spectrometry-based metabolic fingerprinting and PLS-DA-based classification of Brazilian “Malvas”. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 2, p. 365–372, 2015.

MATTHYS, H. *et al.* Efficacy and safety of an extract of *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) in adults with acute bronchitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Phytomedicine**, v. 10, supl. 4, p. 7–17, 2003.

MATTHYS, H. *et al.* Efficacy and tolerability of EPs 7630 tablets in patients with acute bronchitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled dose-finding study with a herbal drug preparation from *Pelargonium sidoides*. **Current Medical Research and Opinion**, v. 26, n. 6, p. 1413–1422, 2010.

MSD - MERCK SHARP AND DOHME. **Manual MSD - Valores laboratoriais normais: sangue, plasma e soro**. 2018. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/multimedia/table/valores-laboratoriais-normais-sangue-plasma-e-soro>>. Acesso em: 12 abr. 2022.

NAPIMOGA, M. H.; YATSUDA, R. Scientific evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 7, p. 809–820, 2010.

OLIVEIRA, A. L. *et al.* Supercritical extraction of coumarin from guaco (*Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*) for pharmaceutical applications. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 83, p. 65–71, 2013.

PARVEEN, A. *et al.* Challenges and guidelines for clinical trial of herbal drugs. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 7, n. 4, p. 329–333, 2015.

POSSEBON, L. *et al.* Anti-inflammatory actions of herbal medicines in a model of chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 99, p. 591–597, 2018.

RAMANITRAHASIMBOLA, D. *et al.* Bronchodilator activity of *Phymatodes scolopendria* (Burm.) Ching and its bioactive constituent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 400–407, 2005.

RITTER, M. R. *et al.* **Mikania in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB5378>>. Acesso em: 21 jul. 2022a.

RITTER, M. R. *et al.* **Mikania in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB5388>>. Acesso em: 21 jul. 2022b.

RITTER, M. R. *et al.* **Mikania in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB5344>>. Acesso em: 21 jul. 2022c.

RITTER, M. R.; MIOTTO, S. T. S. Taxonomia de *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio

Grande do Sul, Brasil. **Hoehnea**, v. 32, n. 3, p. 309–359, 2005.

ROYAL BOTANICAL GARDENS. **Plants of the world online**. Disponível em: <<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:331774-2#descriptions>>. Acesso em: 21 jul. 2022a.

ROYAL BOTANICAL GARDENS. **Plants of the world online**. Disponível em: <<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:160918-2>>. Acesso em: 21 jul. 2022b.

SÁ, R. C. S. *et al.* Evaluation of long-term exposure to *Mikania glomerata* (Sprengel) extract on male Wistar rats' reproductive organs, sperm production and testosterone level. **Contraception**, v. 67, n. 4, p. 327–331, 2003.

_____. Absence of mutagenic effect of *Mikania glomerata* hydroalcoholic extract on adult wistar rats in vivo. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p. 599–604, 2006.

SÁ, R. C. S.; LEITE, M. N.; ALMEIDA, R. N. Toxicological screening of *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, extract in male Wistar rats reproductive system, sperm production and testosterone level after chronic treatment. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 718–723, 2010.

SELVI, M. *et al.* Safety of NR-INF-02, an extract of *Curcuma longa* containing turmerosaccharides, in healthy volunteers: a randomized, open-label clinical trial. **Alternative therapies in health and medicine**, v. 28, n. 2, p. 116–123, 2022.

SERRANTI, S. *et al.* Classification of oat and groat kernels using NIR hyperspectral imaging. **Talanta**, v. 103, p. 276–284, 2013.

SILVA, C. S. *et al.* Chemometric approaches for document dating: handling paper variability. **Analytica Chimica Acta**, v. 1031, p. 28–37, 2018.

SILVA, M. I. G. *et al.* Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 455–462, 2006.

SITOE, B. V. **Aplicação de métodos de seleção de variáveis para o controle de qualidade de biodiesel de pinhão manso e de moringa em misturas com diesel usando espectrometria no infravermelho médio**. 115 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Aplicaciones de la espectrometría en el infrarrojo. In: _____. **Principios de Análisis Instrumental**. 5. ed. Madri: McGraw Hill, 2001. p. 435–461.

SOARES, A. K. A. *et al.* Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de**

Farmacognosia, v. 16, n. 4, p. 447–454, 2006.

SOARES DE MOURA, R. S. *et al.* Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 249–256, 2002.

STEVINSON, C.; ERNST, E. Can St. John's wort trigger psychoses? **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 42, p. 473–479, 2004.

SUN, Y.; QIAN, J. Botanical drug clinical trial: common issues and future options. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 11, n. 1, p. 300–303, 2021.

SUYENAGA, E. S. *et al.* Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 6, p. 519–523, 2002.

TAVARES, J. P. **Estudo de toxicologia clínica de três fitoterápicos à base de associações de plantas, mel e própolis em solutários sadios**. 106 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

TAVARES, J. P. *et al.* Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associações de plantas, mel e própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 350–356, 2006.

UENO, V. A.; SAWAYA, A. C. H. F. Influence of environmental factors on the volatile composition of two Brazilian medicinal plants: *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Metabolomics**, v. 15, p. 1–11, 2019.

VAHTER, M. *et al.* Implications of gender differences for human health risk assessment and toxicology. **Environmental Research**, v. 104, p. 70–84, 2007.

VALDATI, K. D.; HENNEBERG, R.; DO NASCIMENTO, A. J. Hematological reference ranges among healthy adults of Curitiba, PR, Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 5, p. 395–396, 2011.

VASCONCELOS, J. F. *et al.* Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 609, n. 1–3, p. 126–131, 2009.

VIEIRA, R. F. *et al.* Chemical and phylogenetic characterization of guaco (*Mikania laevigata*; *M. glomerata*) germplasm. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 90, p. 1–10, 2020.

WALCZAK, B.; MASSART, D. L. Multiple outlier detection revisited. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 41, n. 1, p. 1–15, 1998.

WANG, M. Generalized estimating equations in longitudinal data analysis: a review and recent developments. **Advances in Statistics**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

WILLIAMSON, M. A.; SNYDER, L. M. **Wallach: interpretação de exames**

laboratoriais. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

WISE, B. M. *et al.* **Chemometrics tutorial for PLS toolbox and solo**. Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, 2006.

YANG, Y. G. *et al.* Quantitative determination and evaluation of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* with different harvesting times using UPLC-UV-MS and FT-IR spectroscopy in combination with partial least squares discriminant analysis. **Biomedical Chromatography**, v. 31, n. 7, p. 1–6, 2017.

ZHAO, Y. *et al.* Discrimination of wild *Paris* based on near infrared spectroscopy and high performance liquid chromatography combined with multivariate analysis. **Plos One**, v. 9, n. 2, p. 1–12, 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0089100>>. Acesso em: 20 de jun. 2019.

ANEXOS

ANEXO 1 – DEPÓSITOS DAS EXSICATAS DE GUACO

CÓDIGO	NÚMERO DO DEPÓSITO (CEN)	ESPÉCIE
RFV2448	88429	<i>Mikania glomerata</i>
RFV2456	88428	<i>Mikania glomerata</i>
RFV2532	88338	<i>Mikania glomerata</i>
DBS96	84431	<i>Mikania glomerata</i>
RBN50	102498	<i>Mikania glomerata</i>
DBS98	88430	<i>Mikania glomerata</i>
RFV2400	88371	<i>Mikania laevigata</i>
RFV2501	88437	<i>Mikania laevigata</i>
DBS99	88372	<i>Mikania laevigata</i>
DBS97	88374	<i>Mikania laevigata</i>
RBN58	88433	<i>Mikania laevigata</i>
RFV2502	88343	<i>Mikania laevigata</i>
RFV2457	88434	<i>Mikania laevigata</i>
RBN35	88365	<i>Mikania laevigata</i>
RFV2531	88440	<i>Mikania laevigata</i>
RFV2429	88438	<i>Mikania laevigata</i>
RBN48	88435	<i>Mikania laevigata</i>
RFV2498	88432	<i>Mikania laevigata</i>
RFV2440	88370	<i>Mikania laevigata</i>
RFV2499	88441	<i>Mikania laevigata</i>
RFV2458	88439	<i>Mikania laevigata</i>
DBS80	88442	<i>Mikania laevigata</i>
RFV924	88295	<i>Mikania laevigata</i>
DBS119	88431	<i>Mikania laevigata</i>

ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO DE COLETA DE DADOS DOS VOLUNTÁRIOS

Data: ___/___/___ Código do voluntário (preenchido pelo pesquisador): _____

1. Dados pessoais:

Nome: _____

Sexo (M/F):___ Peso (kg):___ Altura (m):___ Data de nascimento:___/___/___

RG:_____ CPF:_____

Endereço:_____

Bairro:_____ Cidade:_____

Cep:_____ Fone:_____

Profissão:_____

2. Informações:

Pressão arterial (SIS/DIA – mmHg):_____

Tipo sanguíneo (A/B/AB/O):___ Fator Rh (+/-):___

Responda as perguntas abaixo marcando uma das duas opções:

PERGUNTA	SIM	NÃO
1 – Teve ataque do coração ou derrame cerebral nos últimos três meses?	()	()
2 – Tem pressão alta?	()	()
3 – Teve aneurisma de aorta?	()	()
4 – Está grávida ou amamentando?	()	()
5 – Você é fumante?	()	()
6 – Você é epilético?	()	()
7 – Possui algum diagnóstico de doença crônica (diabetes, asma, entre outras)?*	()	()

*Caso tenha respondido sim, descrever qual doença nas observações.

Liste as medicações que faz uso de forma contínua. Ex: remédios para pressão, coração, diabetes.

Pratica exercícios físicos? **Sim () Não ()

**Quais e com qual frequência?

Observações:

Assinatura

ANEXO 3 – QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA DO VOLUNTÁRIO

Data: ___/___/___ Código do voluntário (preenchido pelo pesquisador): _____

Nome: _____

Etapa do Estudo:

() Primeira visita / () Segunda visita / () Terceira visita / () Quarta visita /
() Quinta visita / () Sexta visita / () Sétima visita

Pressão arterial (SIS/DIA – mmHg): _____

Marque com um “X” uma das opções para as perguntas abaixo:

NA ÚLTIMA SEMANA, O PACIENTE TEVE:		
PERGUNTA	RESPOSTA*	NÚMERO DE EPISÓDIOS NA SEMANA
Tonturas ou vertigens?	() Sim () Não	
Confusão mental?	() Sim () Não	
Dores de cabeça?	() Sim () Não	
Dores abdominais?	() Sim () Não	
Diarreia?	() Sim () Não	
Pirose (azia / queimação)?	() Sim () Não	
Dores nas articulações?	() Sim () Não	
Manchas na pele?	() Sim () Não	
Prurido (coceira)?	() Sim () Não	
Taquicardia?	() Sim () Não	

*Caso tenha respondido sim para alguma das perguntas, informe o número de episódios na semana na última coluna da tabela

Liste as medicações que usou nos últimos três dias, com exceção das que relatou que já faz uso contínuo. Exemplo: remédios para rinite, inflamação, dor, alergias, entre outros.

Realizou exercício físico fora do habitual na última semana? **Sim () Não ()

**Qual e com que duração?

Ingeriu bebida alcóolica nas últimas 24 horas? Sim () Não ()