

5.2.6 Substância 6

A substância **6** se caracterizou como um sólido amorfo (2 mg) de coloração amarelo-parda, obtido do extrato acetato de etila fracionado em coluna de sílica eluída com mistura gradiente de clorofórmio:metanol, seguido de duas etapas de refractionamento seqüencial em Sephadex LH-20 eluído com metanol (Figura 18).

A análise cromatográfica realizada em cromatoplasmas de sílica gel e celulose microcristalina eluídas com clorofórmio:ácido acético:metanol:água (64:32:12:08) e reveladas com NP/PEG (fluorescência azul) ou cloreto férrico 5% (cor azul) forneceu Rf de 0,45 e 0,3, respectivamente.

Os perfis espectrais adquiridos pelos experimentos uni (RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135°) e bidimensionais (*g*HSQC e *g*HMBC) são compatíveis com uma flavanona monoglicosilada unida a uma unidade de galoila (Figuras 54-62).

Com relação a porção flavônica são identificados os mesmos sinais discutidos para as substâncias **2** (diidrokaempferol) e **5** (diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo), onde atribui-se presença de hidroxilas em C3, C5, C7 e C4', além de C3 ser caracterizado como oximetínico garantindo a ausência de ligação olefínica entre C2 e C3.

Os deslocamentos químicos discutidos para **3** (ácido gálico) também são observados em **6** sugerindo a presença da porção galoila esterificada com a unidade monosídica do diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo através da carboxila do ácido gálico (C7) com o carbono metilênico carbinólico da glicose (C6''). A proposta para este ponto de união é fundamentada pelos sinais de H6'' que, em **6**, são observados em campo de menor proteção como um duplete em δ 4,36 ($J= 6$ Hz) e não como dois dupletos referentes a H6a'' e H6b'' de **5** (δ 3,60 e 3,73), destacando a modificação do grupo funcional próximo a H6'' para ambiente estéro-eletrônico mais eletronegativo (Figuras 54-62). A correlação deste duplete (δ 4,36) com o sinal em δ 167,65 de C7''', observado no mapa de contornos *g*HMBC, corrobora a proposta do grupo galoila estar esterificado com o açúcar em H6'' (Figura 61 e 62).

O espectro de massas forneceu pico do íon molecular m/z 601,1235 relativo a fórmula $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{O}_{15}^-$, com fragmentações em m/z 271,0606 ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_5^-$) e m/z 449,1084 ($\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}^-$), reforçando a presença de unidade galoila unida ao diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo (Figura 63).

Os sinais de ^1H observados em δ 2,97 e 2,85 associados com os sinais de ^{13}C em δ 35,60 e 30,3 caracterizam a presença de grupos metoxila, entretanto, os resultados obtidos pelo espectro de massas impossibilitam esta suposição (Figuras 54-63). Tais sinais podem estar relacionados com contaminante na amostra.

Sendo assim, todos os dados espectrais indicam que **6** trata-se do diidrokaempferol-3-O- β -(6''galoil)-glicopiranosídeo. Até o momento, não foram encontrados dados na literatura sobre esta substância. A Tabela 10 correlaciona os sinais espectrais por RMN ^1H e ^{13}C da substância **6** com os dados da literatura para o ácido gálico e o diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo.

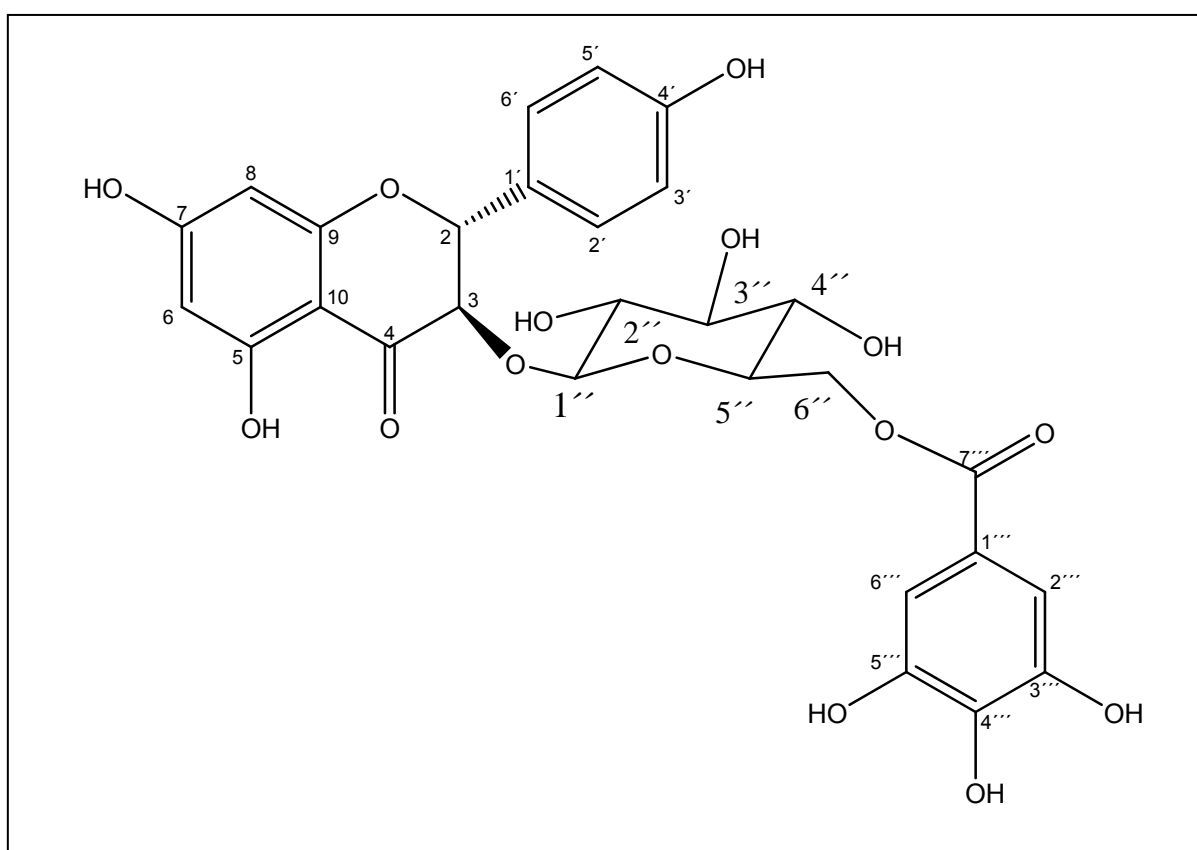


Figura 53 – Proposta para estrutura molecular da substância **6** [dihidrokaempferol-3-O- β -(6''galoil)-glicopiranosídeo].

Tabela 10 – Comparação entre os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) da substância **6** e dados da literatura para o diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo e o ácido gálico

Posição	Tipo de C	Substância 6		Porção molecular: diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo** (139)	
		^1H δ (M, J em Hz)	^{13}C δ	^1H δ (M, J em Hz)	^{13}C δ
2	CH	5,24 (d, 10,0)	82,16	5,26 (d, 10,0)	83,5
3	CH	4,81 (d, 10,0)	76,08	4,95 (d, 10,0)	78,2
4	C	-	194,47	-	195,5
5	C	-	162,73	-	165,6
6	CH	5,93 (d)	95,03	5,91 (d, 2,0)	96,9
7	C	-	166,93	-	170,9
8	CH	5,87 (d)	95,03	5,89 (d, 2,0)	96,9
9	C	-	163,521	-	164,2
10	C	-	101,20	-	102,6
1'	C	-	127,18	-	128,7
2'	CH	7,24 (d, 8,5)	128,99	7,36 (m)	130,4
3'	CH	6,73 (d, 8,5)	114,83	6,81 (m)	116,2
4'	C	-	157,79	-	159,3
5'	CH	6,73 (d, 8,5)	114,83	6,81 (m)	116,2
6'	CH	7,24 (d, 8,5)	128,99	7,36 (m)	130,4
1''	CH	3,98 (d, 7,4)	100,70	3,82 (d, 8,0)	102,6
2''	CH		73,11		74,6
3''	CH		74,30		77,2
4''	CH	3,08 -3,43 (m)	69,95	2,98 – 3,25 (m)	71,2
5''	CH		75,30		77,6
6a''	CH ₂	4,36 (d, 6,0)	62,99	3,59 (dd, 5,5)	62,6
6b''				3,75 (dd, 2,5)	
Porção molecular: ácido gálico*** (92)					
1'''	C	-	120,07	-	120,7
2'''	CH	7,10 (s)	108,83	7,08 (s)	109,1
3'''	C	-	145,14	-	145,1
4'''	C	-	138,48	-	138,3
5'''	C	-	145,14	-	145,1
6'''	CH	7,10 (s)	108,83	7, 8 (s)	109,1
7'''	C	-	167,65	-	169,1

*TMS δ 0; CD₃OD; ^1H 300 MHz; ^{13}C 75 MHz.**TMS δ 0; CD₃OD; ^1H 500 MHz; ^{13}C 90,6 MHz.*** TMS δ 0; CD₃OD; ^1H 300 MHz; ^{13}C 75 MHz.

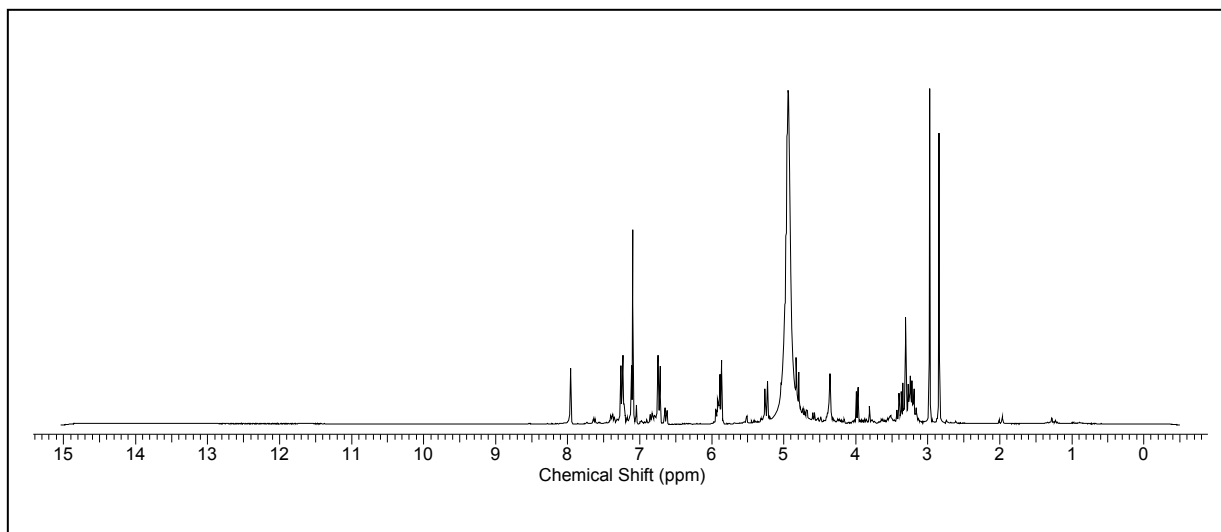


Figura 54 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) da substância **6**.

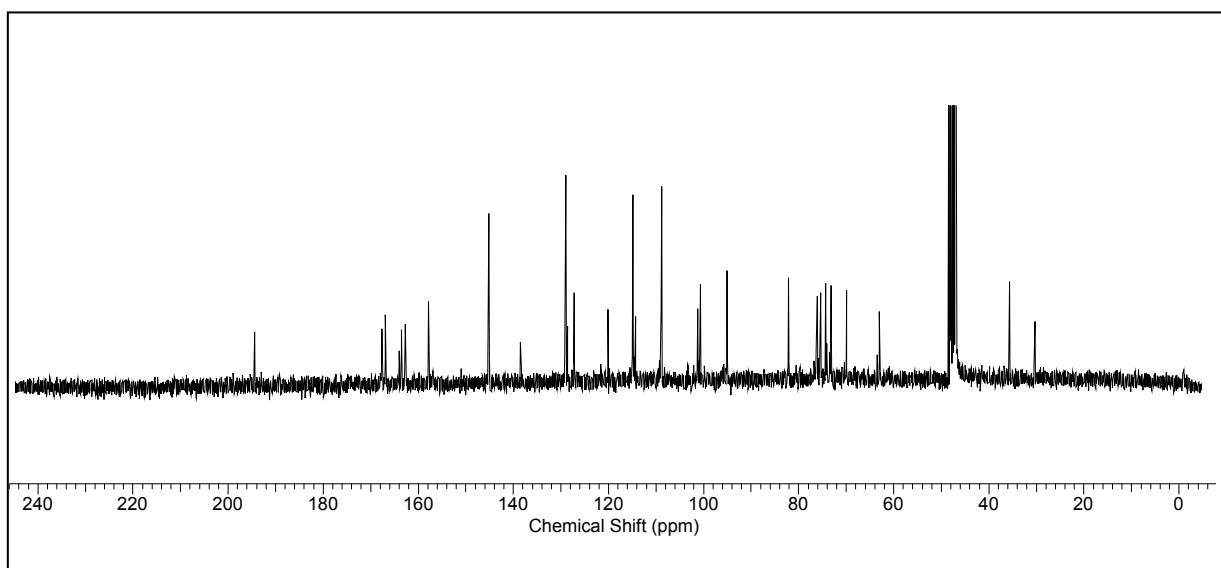


Figura 55 – Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, CD_3OD) da substância **6**.

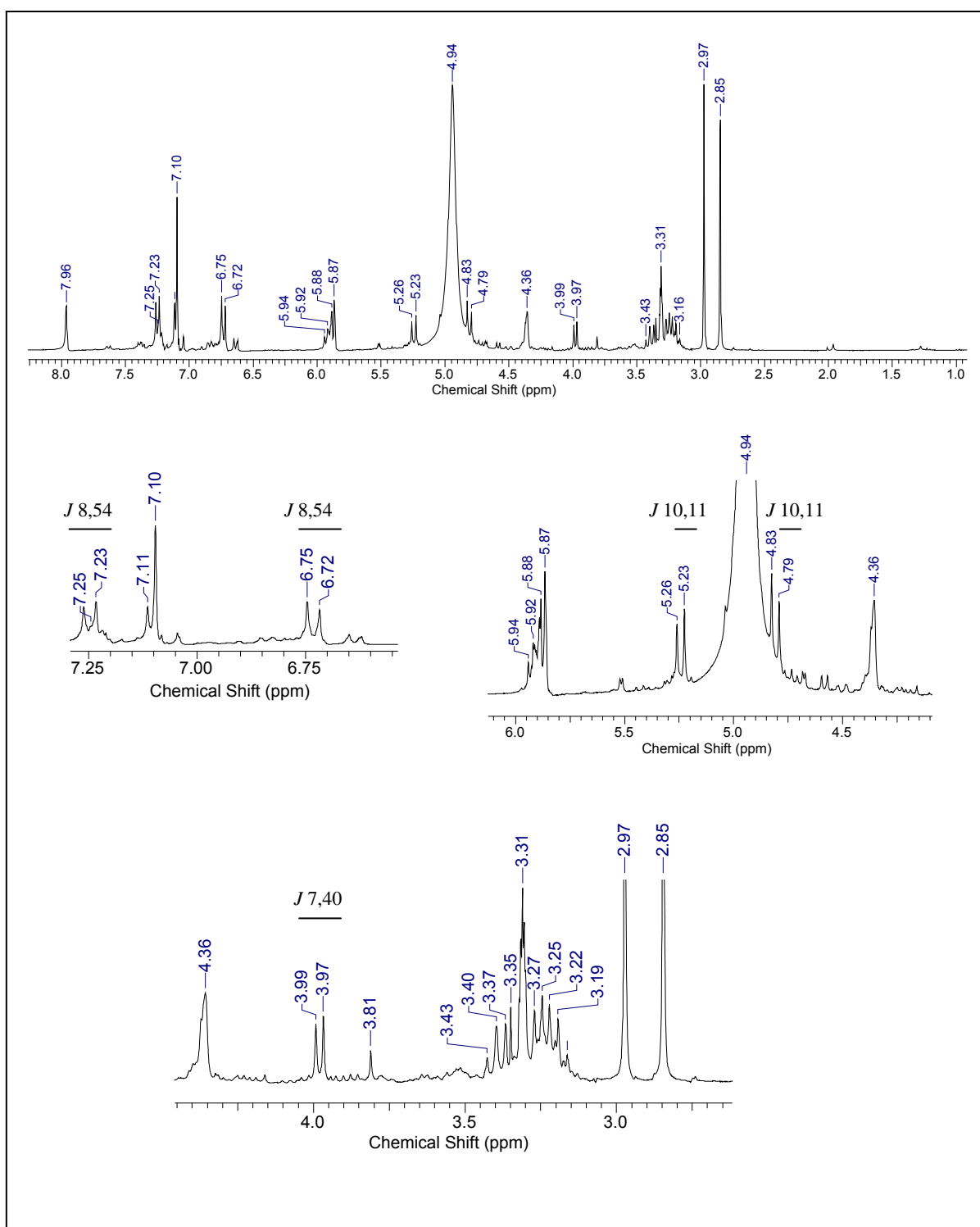


Figura 56 – Expansões do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) da substância **6**, nas regiões entre δ 1,0–8,0; 6,5–7,3; 4,0–6,2 e 2,5–4,5.

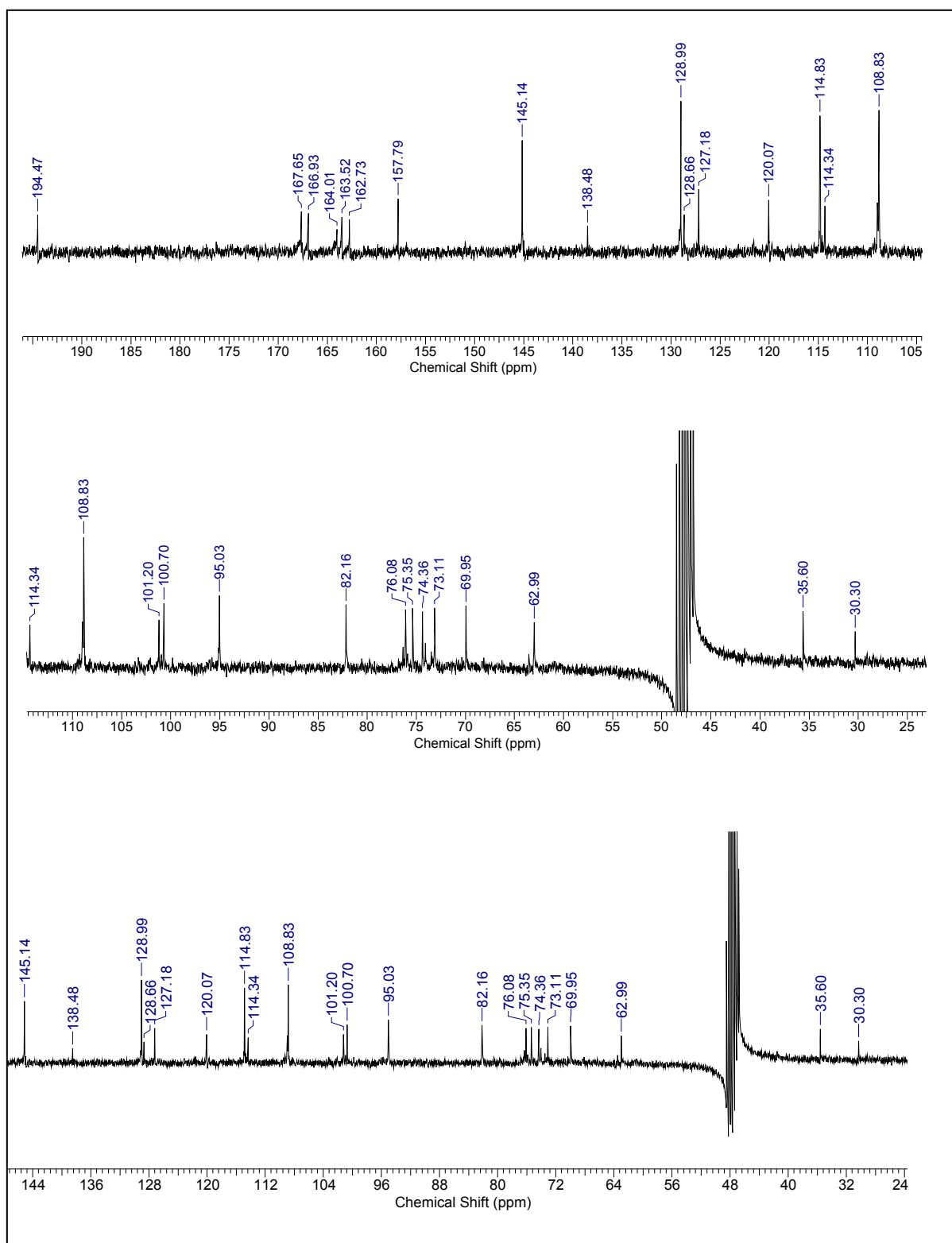


Figura 57 – Expansões do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) da substância **6**, nas regiões entre δ 105-200, 25-120 e 24-145.

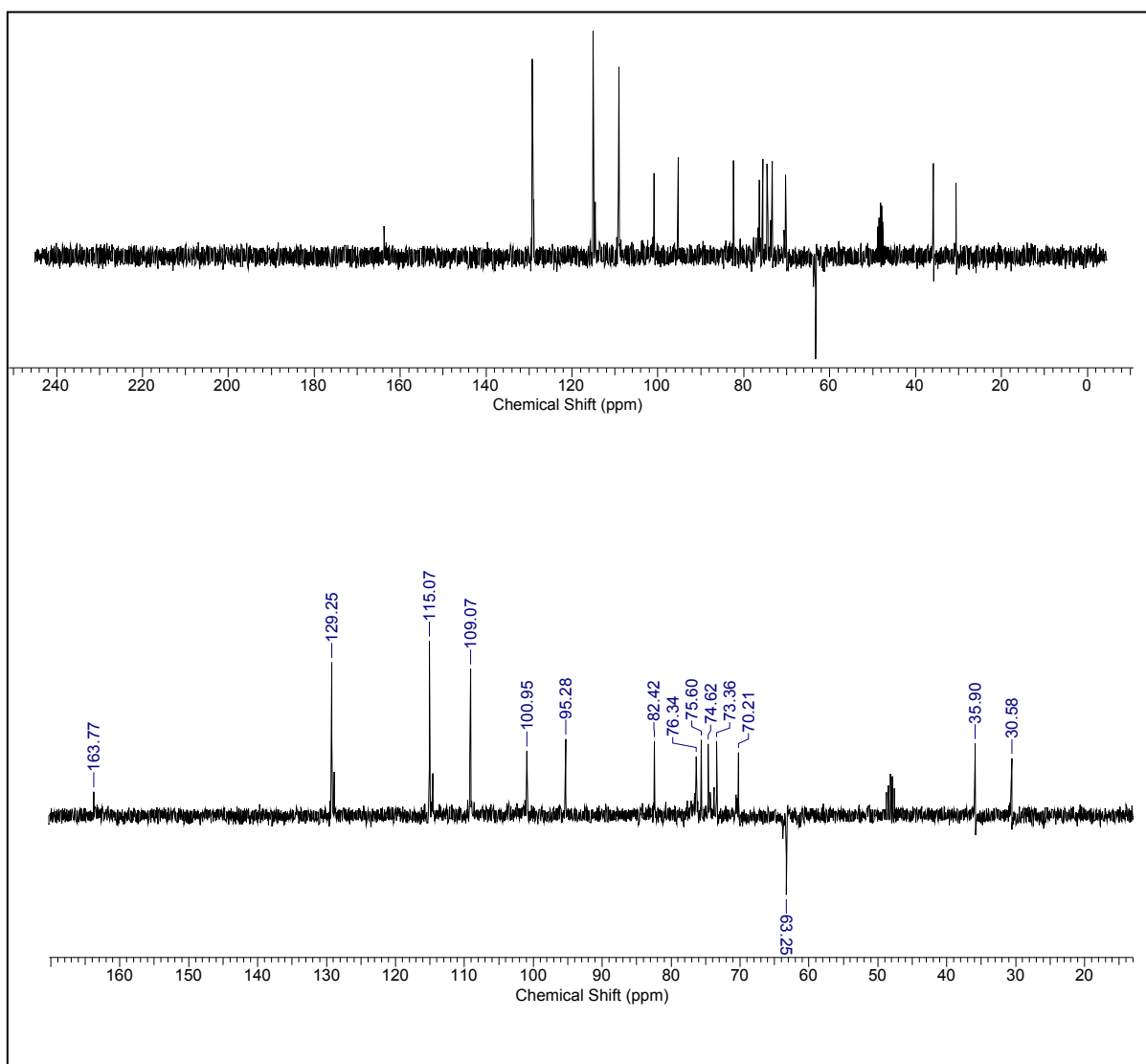


Figura 58 – Espectro de DEPT 135° (75 MHz, CD₃OD) da substância **6** e ampliação na região entre δ 10 e 170.

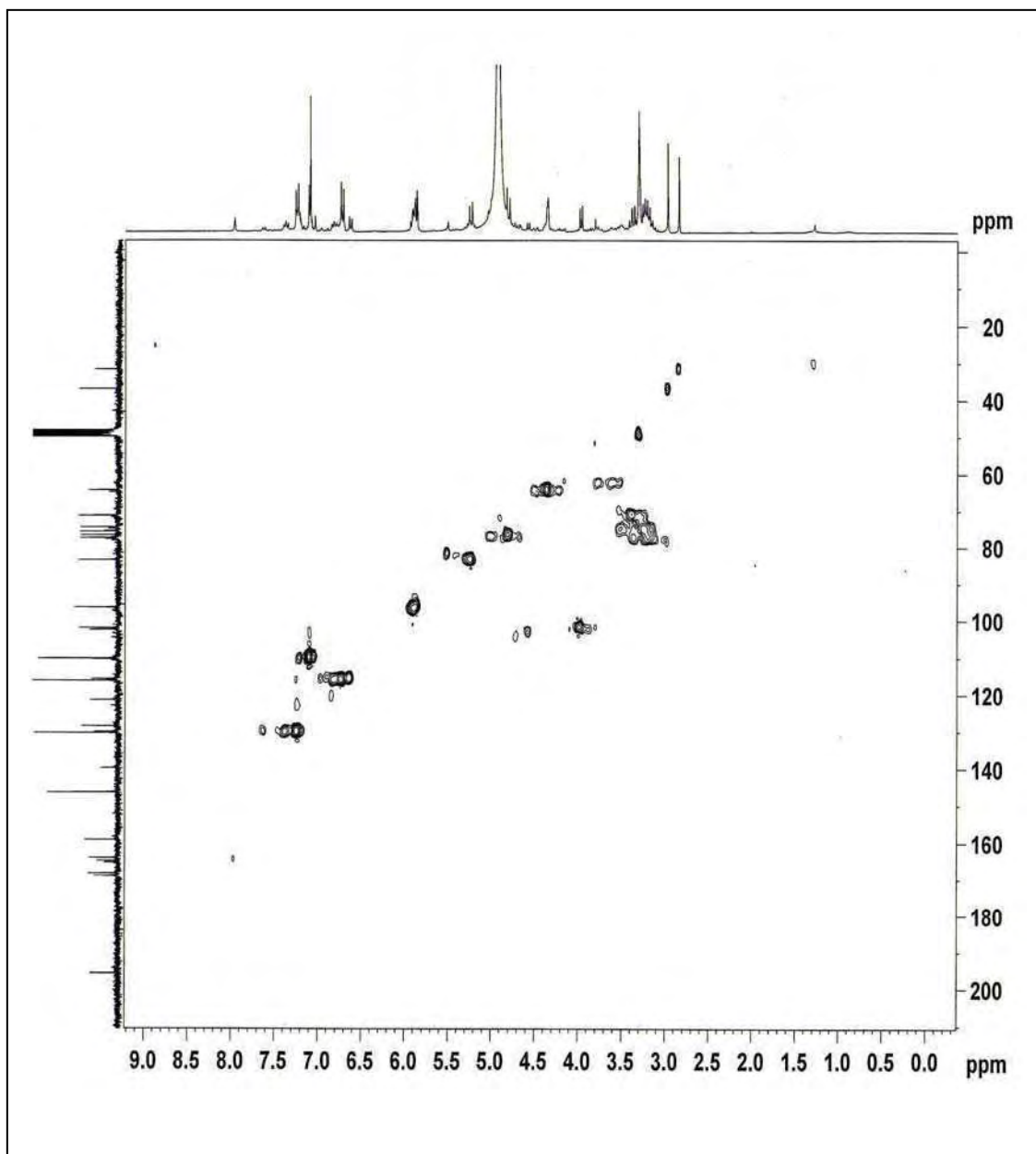


Figura 59 – Espectro gHSQC (300 MHz/75 MHz, CD₃OD) da substância **6**.

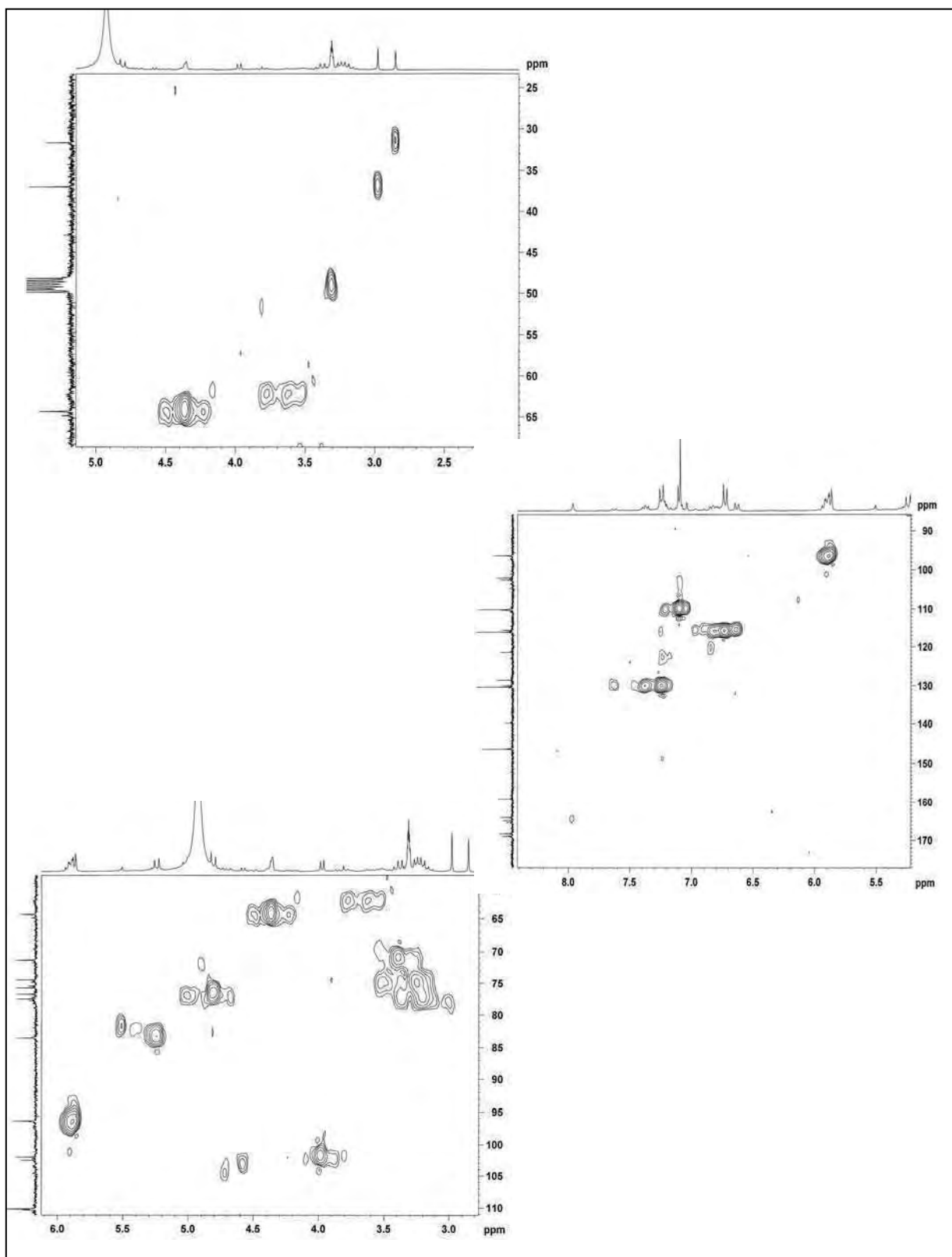


Figura 60 – Ampliações do espectro de gHSQC (300 MHz/75 MHz, CD₃OD) da substância **6**, nas regiões entre δ 2,8-6,0 x 60-110; 2,0-5,0 x 25-70 e 5,0-8,5 x 90-180.

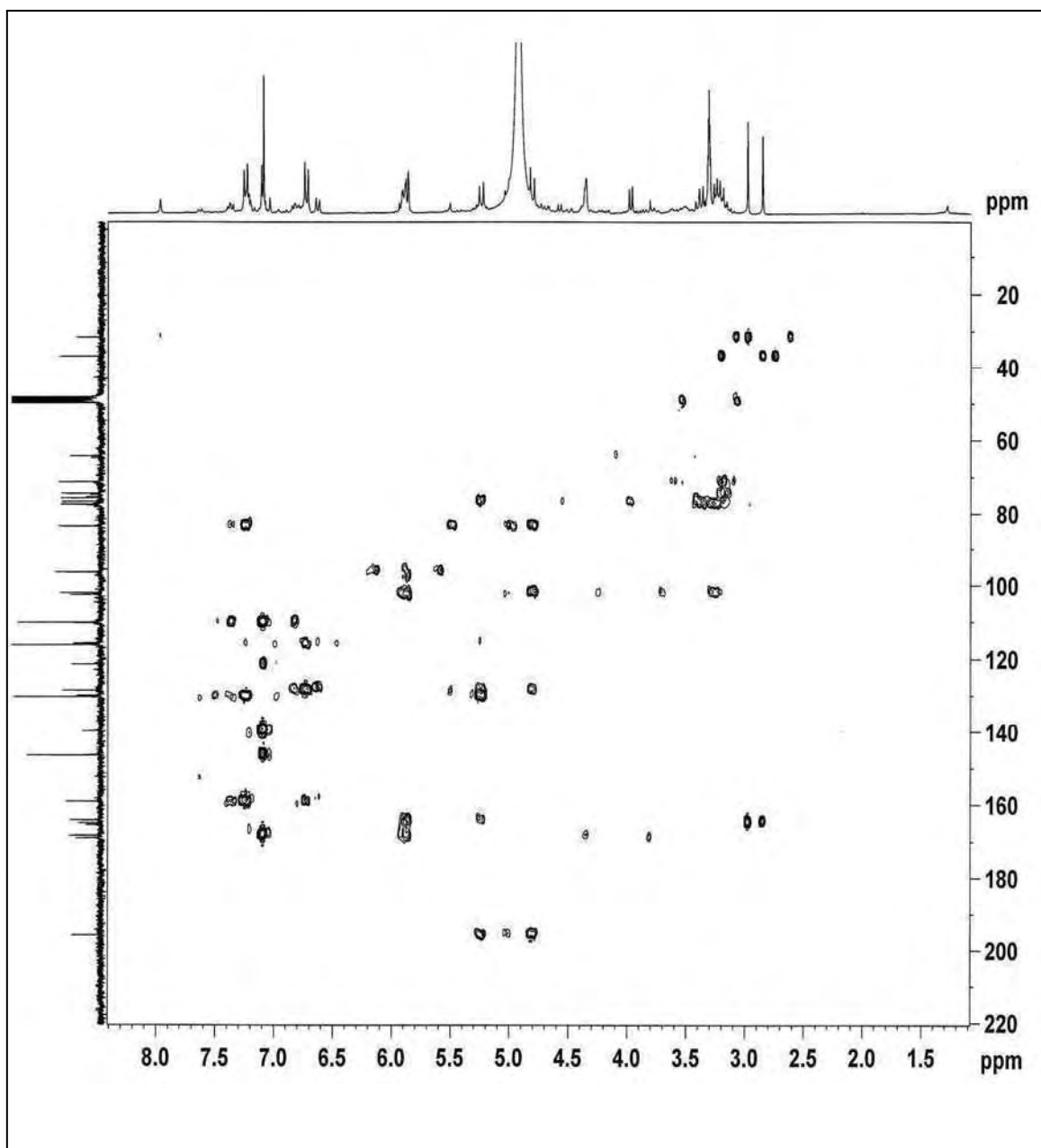


Figura 61 – Espectro gHMBC (300 MHz/75 MHz, CD₃OD) da substância **6**.

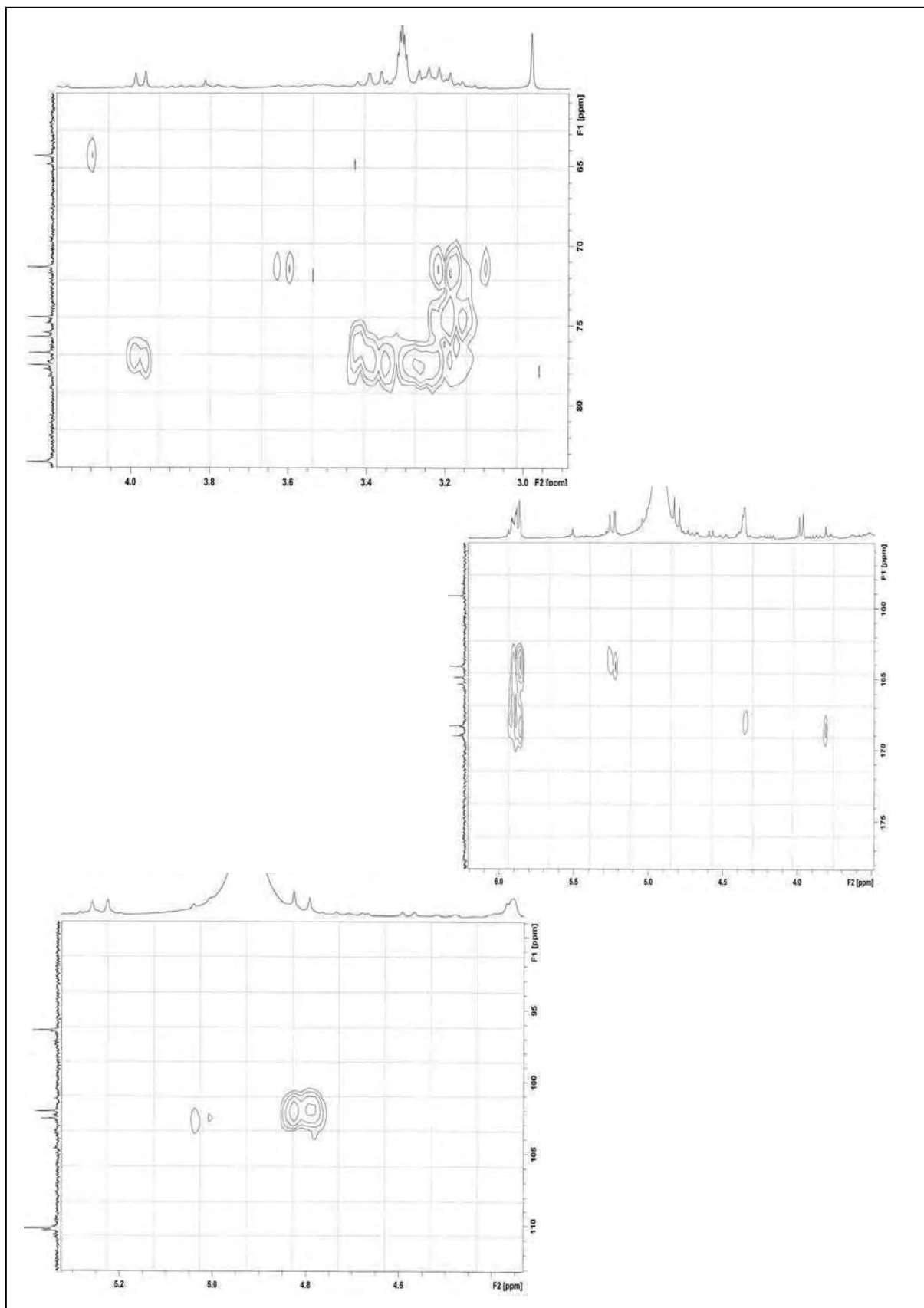


Figura 62 – Ampliações do espectro gHMBC (300 MHz/75 MHz, CD₃OD) da substância **6**, as regiões entre δ 4,5-5,5 x 90-115; 2,8-4,5 x 60-90 e 3,4-6,5 x 150-180.

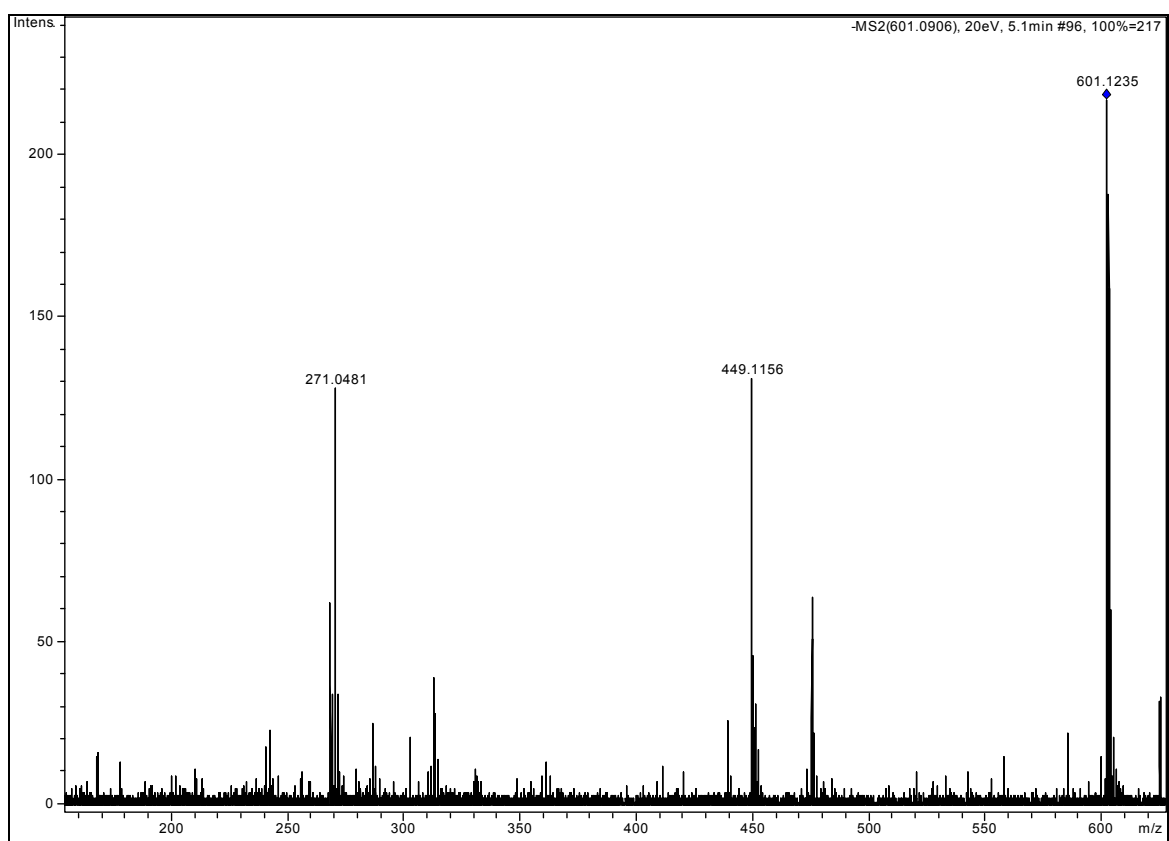


Figura 63 – Espectro de massas da substância **6** no modo de ionização negativo.

5.2.7 Substâncias 7 e 8

Os compostos **7** e **8** foram obtidas em mistura (50 mg) por cristalização espontânea a partir de uma solução hidroetanólica (9:1) preparada com a raiz de *C. regium* (10%), seguido de resfriamento (5-10°C) por, aproximadamente, 15 dias. Apresentou aspecto cristalino incolor (Figura 64), sendo muito solúvel em clorofórmio e metanol e com ponto de fusão entre 25-30°C.

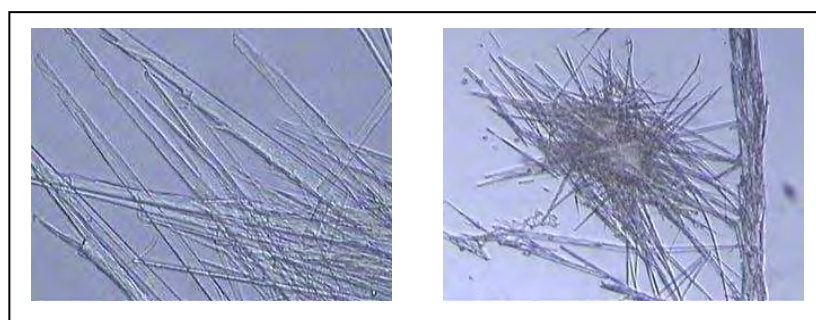


Figura 64 – Cristais aciculares da misturas das substância **7** e **8** obtida após resfriamento da solução hidroetanólica de *C. regium*.

O conjunto de sinais e os deslocamentos químicos adquiridos por RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135°, indicam que **7** e **8** possuem carbonila (δ 199,3), carbonos quaternário (δ 137,84) e metínico (δ 131,10) de anel aromático ou de alcenos conjugados, além de carbonos metilênico (δ 38,9-22,67) e metila (δ 14,10) (Figuras 66-75). A presença do simpleto em δ 8,66 associado a apenas um sinal de carbono metilênico em δ 131,10 sugerem que a ligação olefínica conjugada estar entre um carbono metilênico e um carbono quaternário (δ 137,84) (132, 133). O conjunto destes dados espectrais associado ao padrão quimiotaxonômico de *Cochlospermum* sp. sugerem que a identidade química de **7** e **8** como triacilbenzenos do tipo das cochlosperminas [19, 22-24] (89, 92).

O mapa de contornos gHSQC indicou correlação heteronuclear direta entre o sinal em δ 38,90 e o tripleto em 3,03 ppm caracterizando a identificação de C1'' e H1''. Também forneceu acoplamento entre os sinais dos hidrogênios (δ 0,86, t) e do carbono da metila terminal da cadeia alquílica (δ 14,10). Ainda por este experimento, os hidrogênios metilênicos H2' do carbono β acoplaram com o sinal em campo de maior blindagem em δ 24, enquanto que os hidrogênios do simpleto intenso em δ

1,24 foram correlacionados com o sinal em δ 31 atribuído ao ante-penúltimo carbono do grupo alquílico (Figura 71) (132, 133). As correlações heteronucleares à longa distância fornecidas por gHMBC confirmaram as atribuições sugeridas para triacilbenzenos conforme apresentado na Tabela 11 e na Figura 72.

A análise por CG-EM desta mistura possibilitou a separação das substâncias **7** e **8** com tempos de retenção de 81,87 (84,9% área) e 119,9 min (15,09% área) fornecendo, respectivamente, picos dos íons moleculares m/z 624 ($C_{42}H_{72}O_3$) e de 652 ($C_{44}H_{76}O_3$) (Figuras 73-75). O conjunto de sinais espectrais associado à massa molecular e ao padrão quimiotaxonômico de *Cochlospermum*, permitiu caracterizar as substâncias **7** e **8** como os triacilbenzenos conhecidos como cochlosperminas A e B (89, 92).

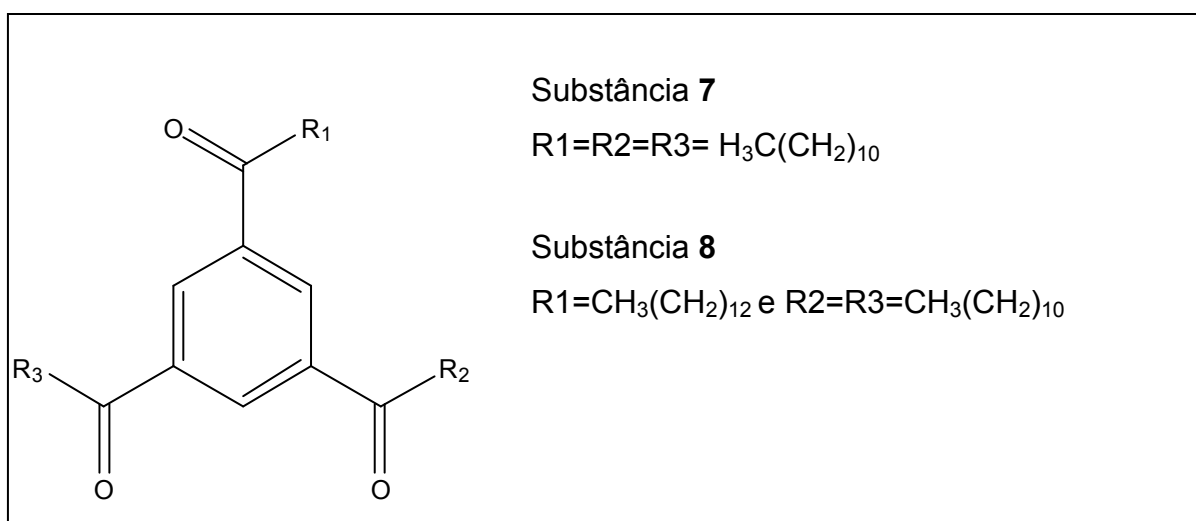


Figura 65 – Estrutura molecular da substância **7** (cochlospermina A) e **8** (cochlospermina B).

Conforme comentado no tópico 2.4, os triacilbenzenos cochlosperminas A [22], B [23], C [19] e D [24] foram isolados das cascas de *C. plachonii*, espécie nativa da África do Sul utilizada popularmente para o tratamento de transtornos hepáticos e malária [ADDAE-MENSAH *et al.* citado por RITTO (23), 89].

Já da raiz de *C. regium*, Ritto (23) identificou a 1-hidroxitetradecanona que, conforme Addae-Mensah *et al.* citado por Ritto (23), é precursora das cochlosperminas.

Da raiz de *C. vitifolium*, Almeida *et al.* (92) isolaram, entre outros compostos, o triacilbenzeno 1-dodecanoil-3,5-di(tetradecanoil)benzeno. Estes autores sugerem um padrão quimiotaxonômico para o gênero incluindo sesquiterpenos, cetonas alifáticas de cadeia longa, flavonóides e triacilbenzenos. Neste contexto, a presença da cochlosperminas A e B aqui comprovada reforça a proposta de Almeida *et al.* (92).

Tabela 11 – Comparação entre os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) da mistura com as substâncias 7 e 8 e dados da literatura para a cochlospermina B (1-dodecanoil-3,5-di(tetradecanoil)benzeno)

Posição	Tipo de C	Mistura 7 e 8**		1-dodecanoil-3,5-di(tetradecanoil)benzeno*** (92)	
		^1H δ (M, J em Hz)	^{13}C δ	^1H δ (M, J em Hz)	^{13}C δ
1,3,5	CH	8,66 (s)	131,10	8,69 (s)	131,0
2,4,6	C	-	137,84	-	138,0
7	C	-	199,32	-	199,9
1'	CH ₂	3,03 (t)	38,90	3,03 (t, 7,2, 3 x CH ₂)	39,1
2'	CH ₂	1,75 (quinteto)	24,13	1,76 (m, 3 x CH ₂)	32,1
3'	CH ₂		29,60		*
4'	CH ₂		29,48		*
5'	CH ₂		29,45		*
6'	CH ₂		29,45		*
7'	CH ₂	1,30 (s)	29,32	1,30 (s intenso, 2 x 10 CH ₂ + 8 CH ₂)	*
8'	CH ₂		29,25		*
9'	CH ₂		31,92		*
10'	CH ₂		22,67		*
11'	CH ₃	0,86 (t)	14,10	0,89 (t, 3 x CH ₃)	14,3

*valores não informados pelos autores.

**TMS δ 0; CDCl₃; ^1H 300 MHz; ^{13}C 75 MHz.

***TMS δ 0; CD₃OD; ^1H 300 MHz; ^{13}C 75 MHz.

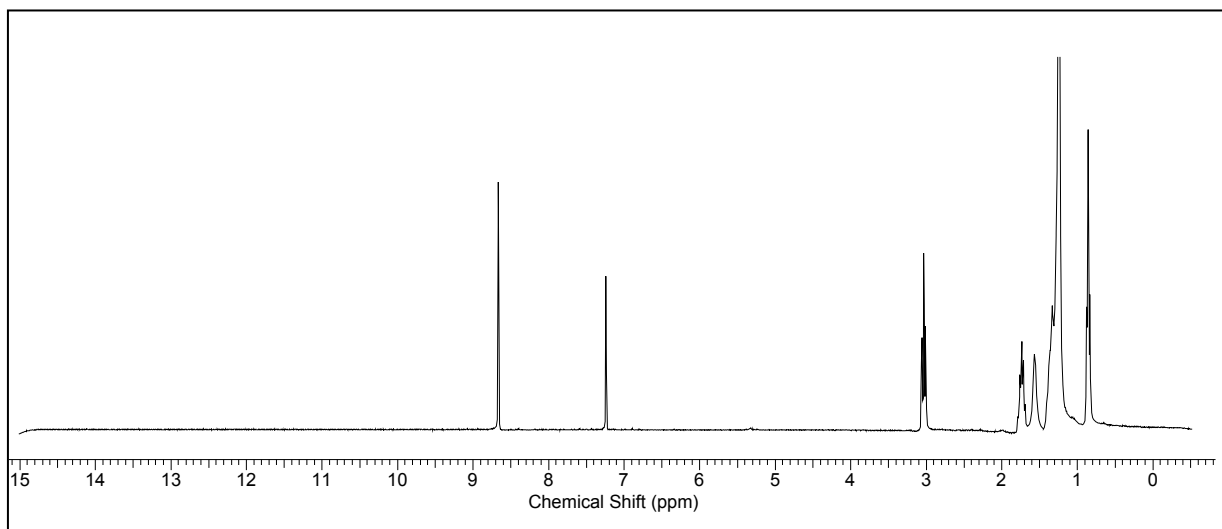


Figura 66 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura de **7** e **8**.

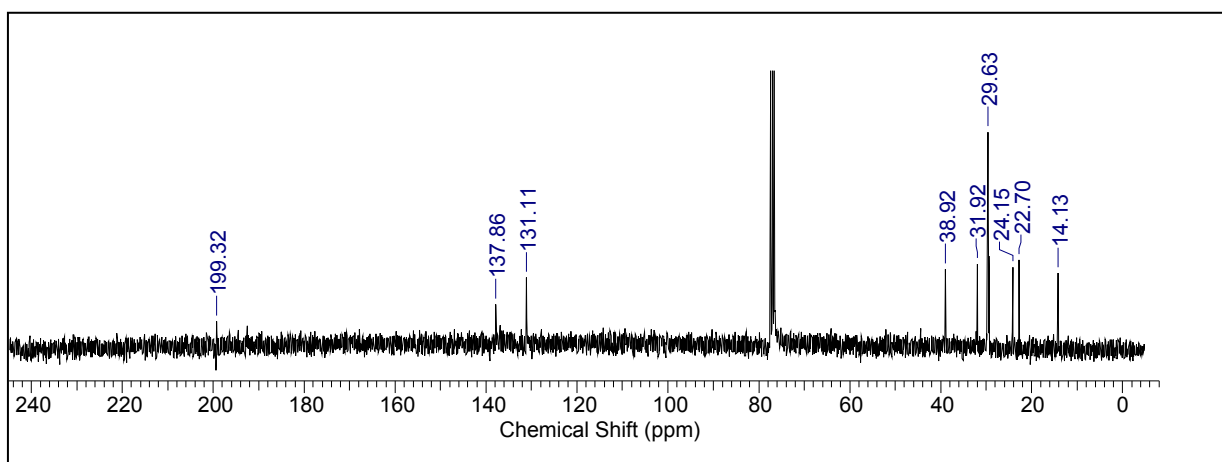


Figura 67 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da mistura de **7** e **8**.

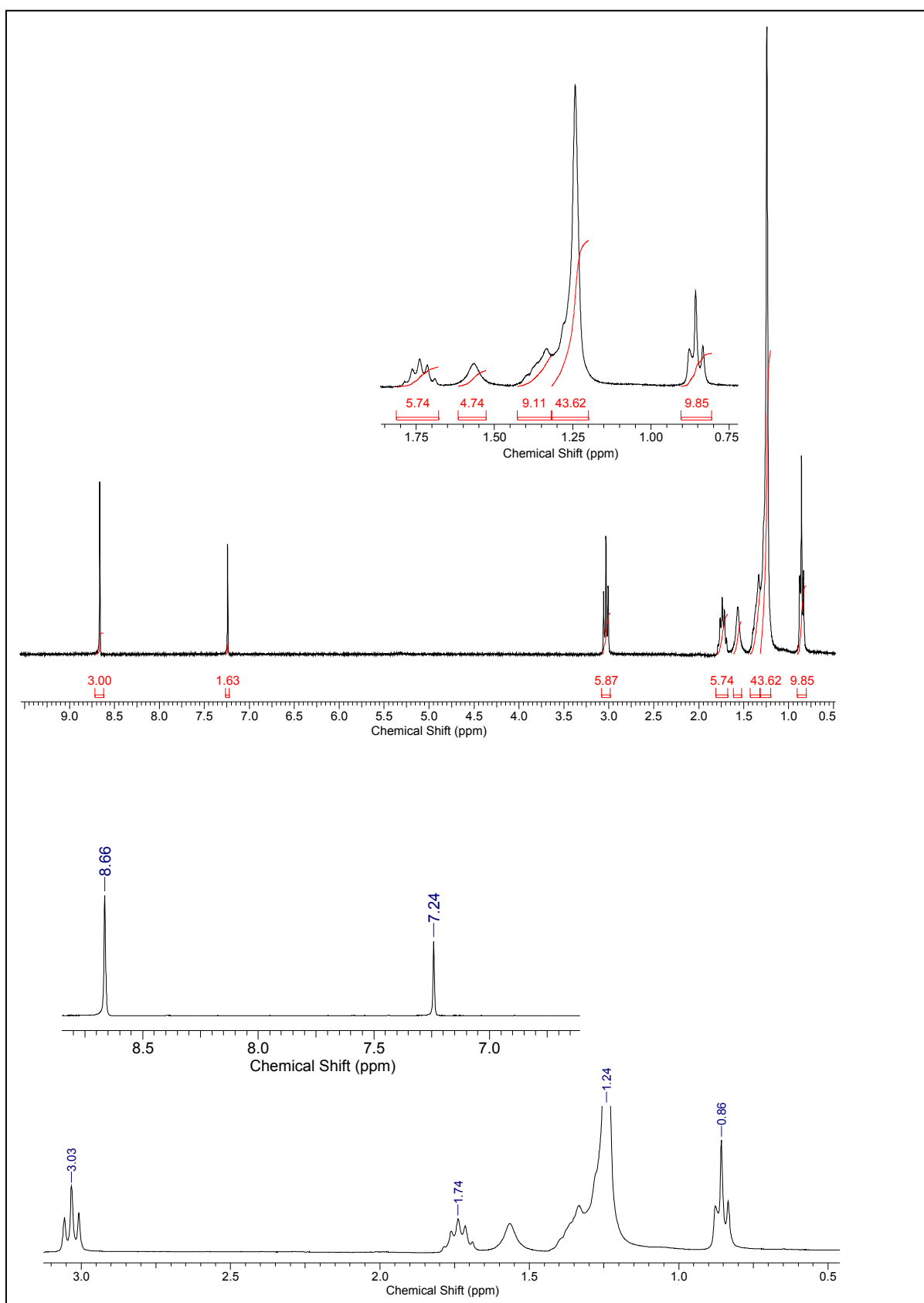


Figura 68 - Expansões do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura de 7 e 8 nas regiões entre δ 0,75–1,80; 0,5–9,5; 6,5–9,0 e 0,5–3,2.

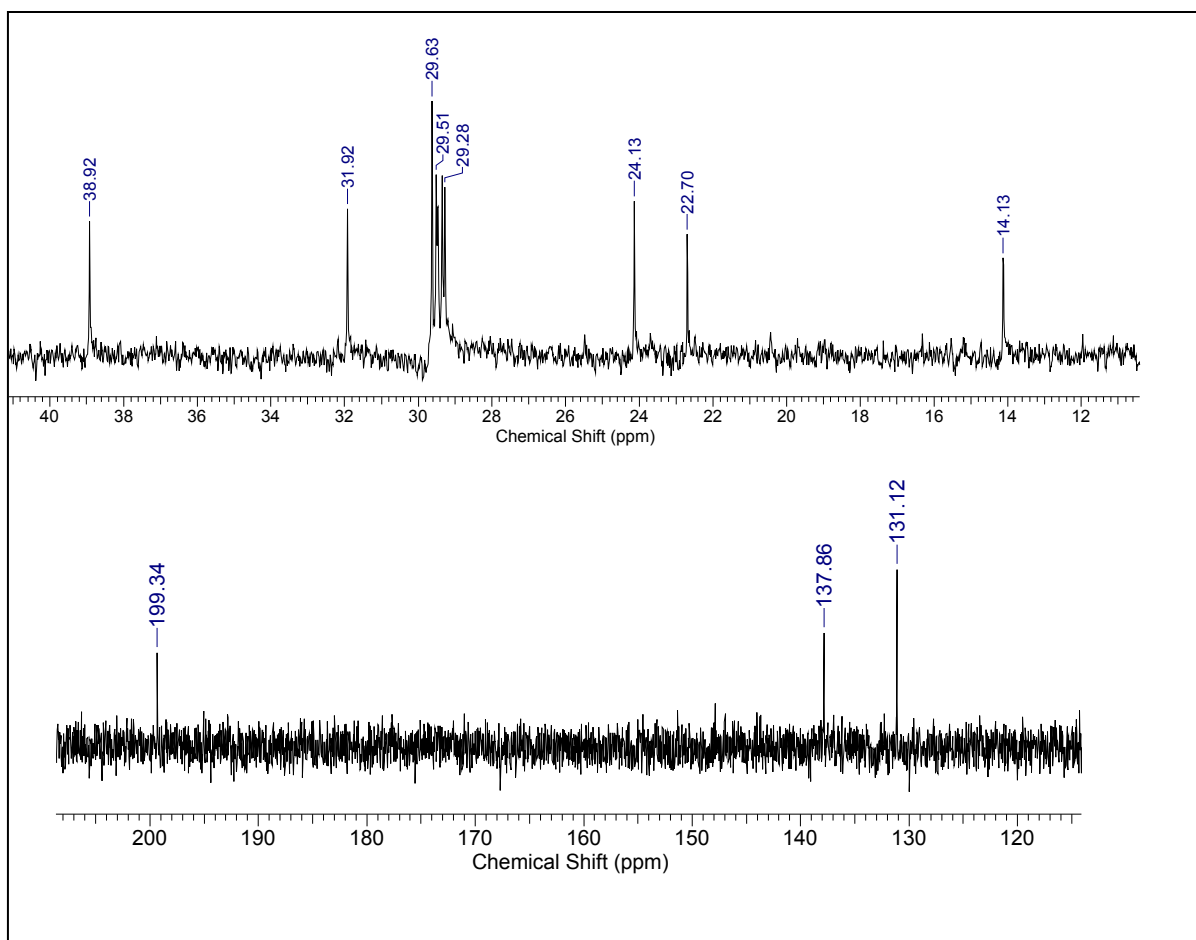


Figura 69 – Expansões do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da mistura de **7** e **8**, nas regiões entre δ 11-40 e 115-210.

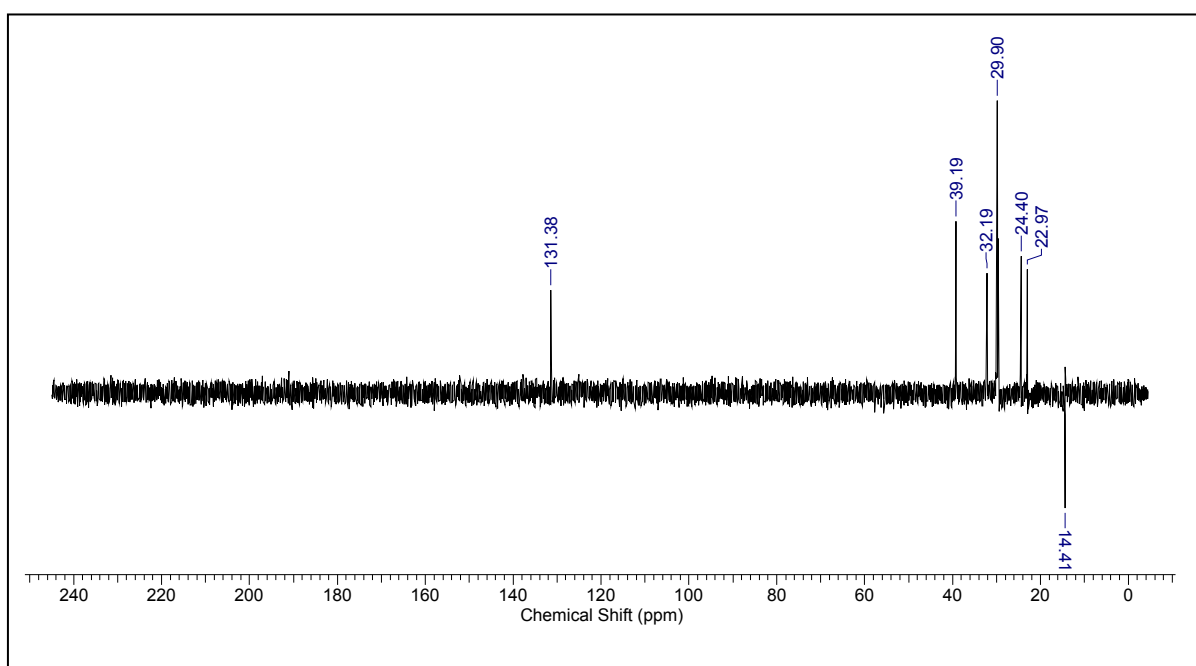


Figura 70 – Espectro de DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) da mistura de **7** e **8**.

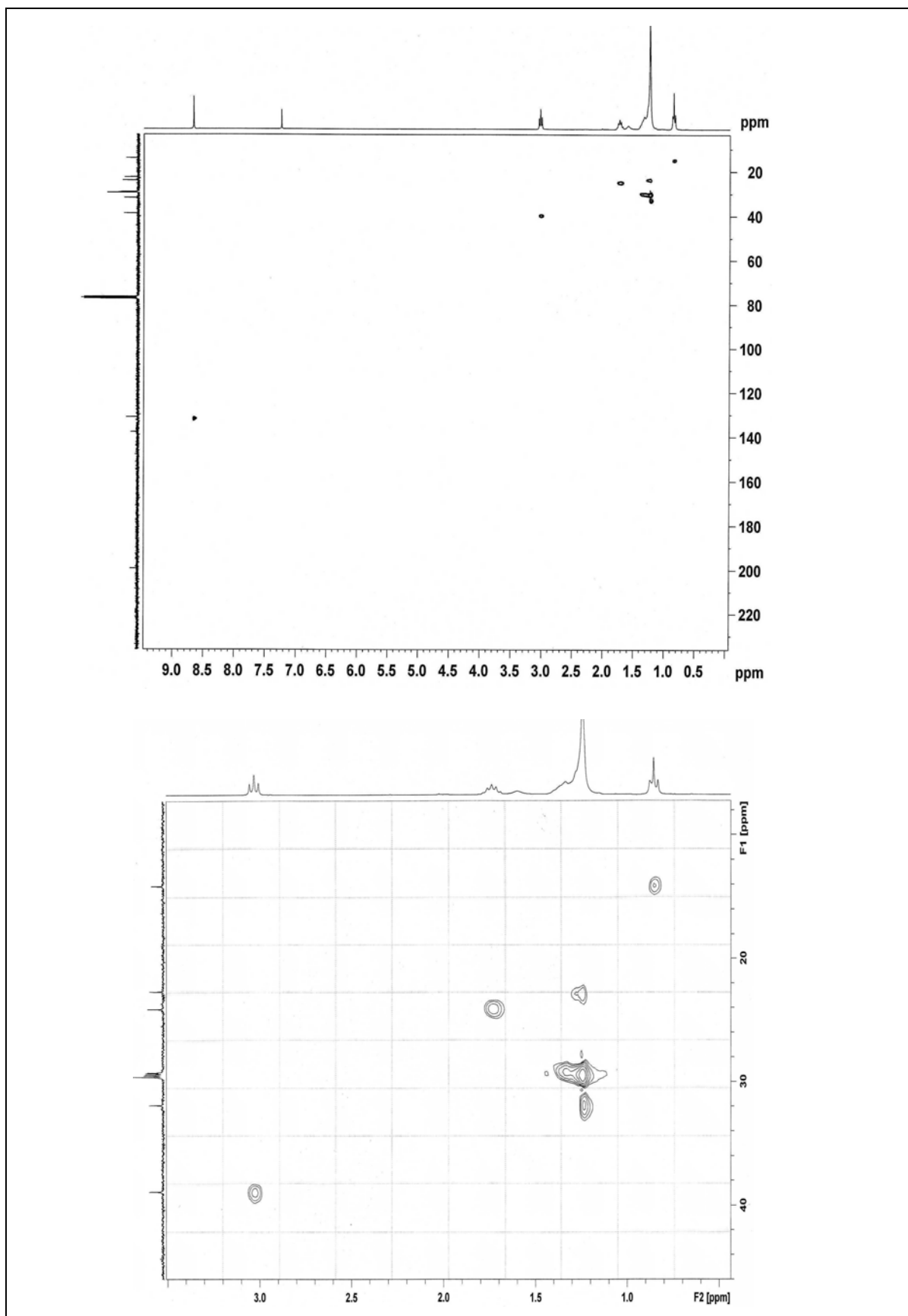


Figura 71 – Espectro gHSQC (300 MHz/75 MHz, MeOD) da mistura de **7** e **8** e expansões nas regiões entre δ 0,0-3,5 x 0-45.

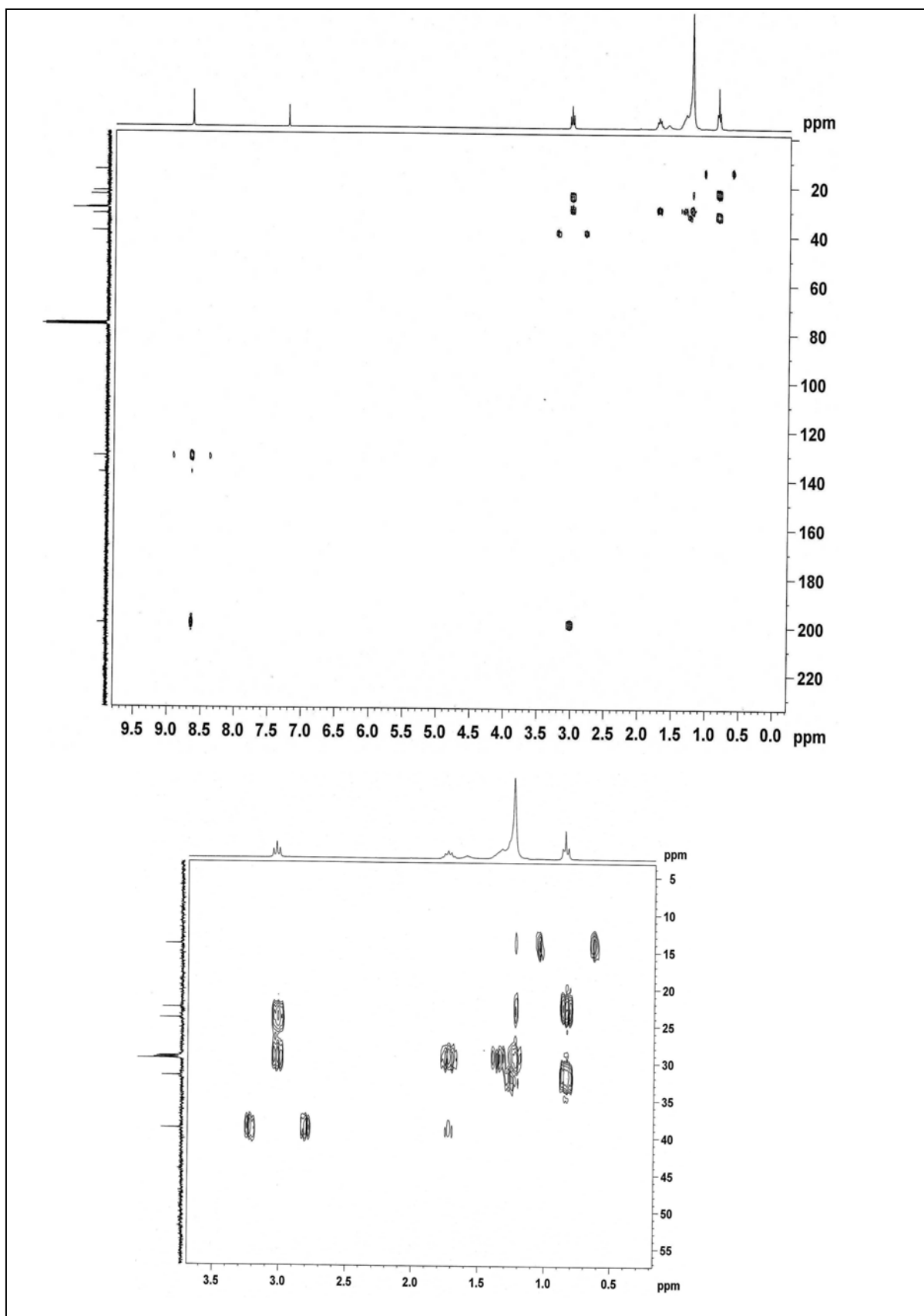


Figura 72 – Espectro gHMBC (300 MHz/75 MHz, MeOD) da mistura de **7** e **8** e expansões nas regiões entre δ 0,0-3,5 x 5-55.

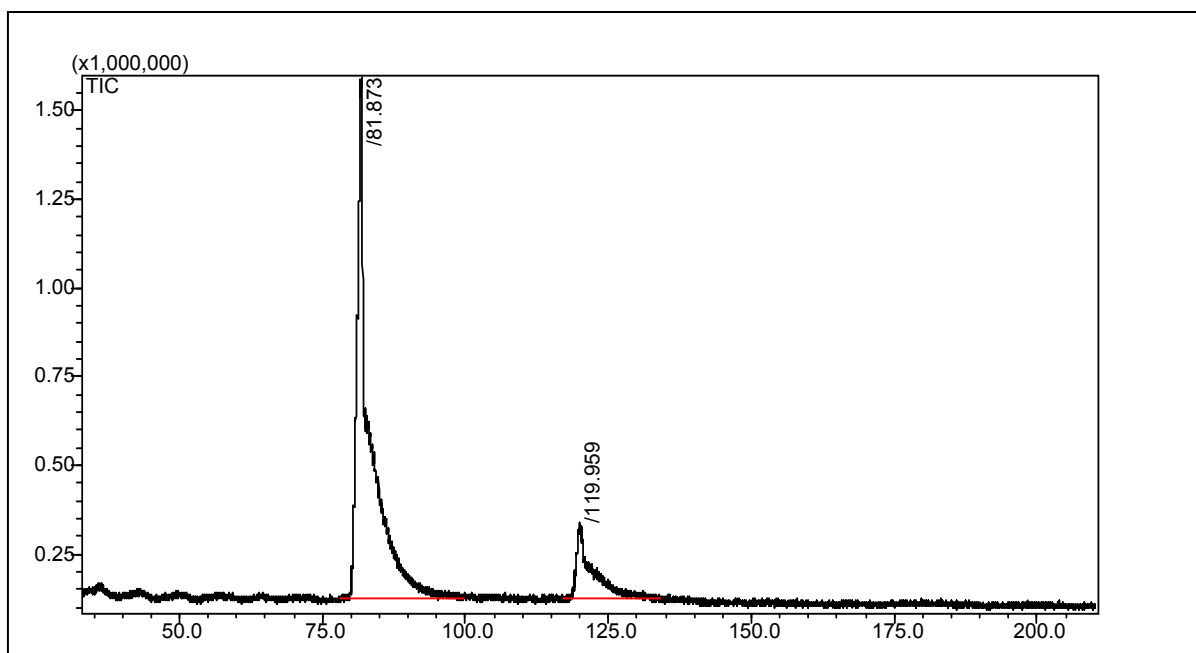


Figura 73 – Perfil cromatográfico por CG da mistura de **7** e **8** utilizando coluna DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) mantida em temperatura constante de 300 °C, Hélio como gás de arraste em fluxo de 1,3 mL/min, durante 220 min.

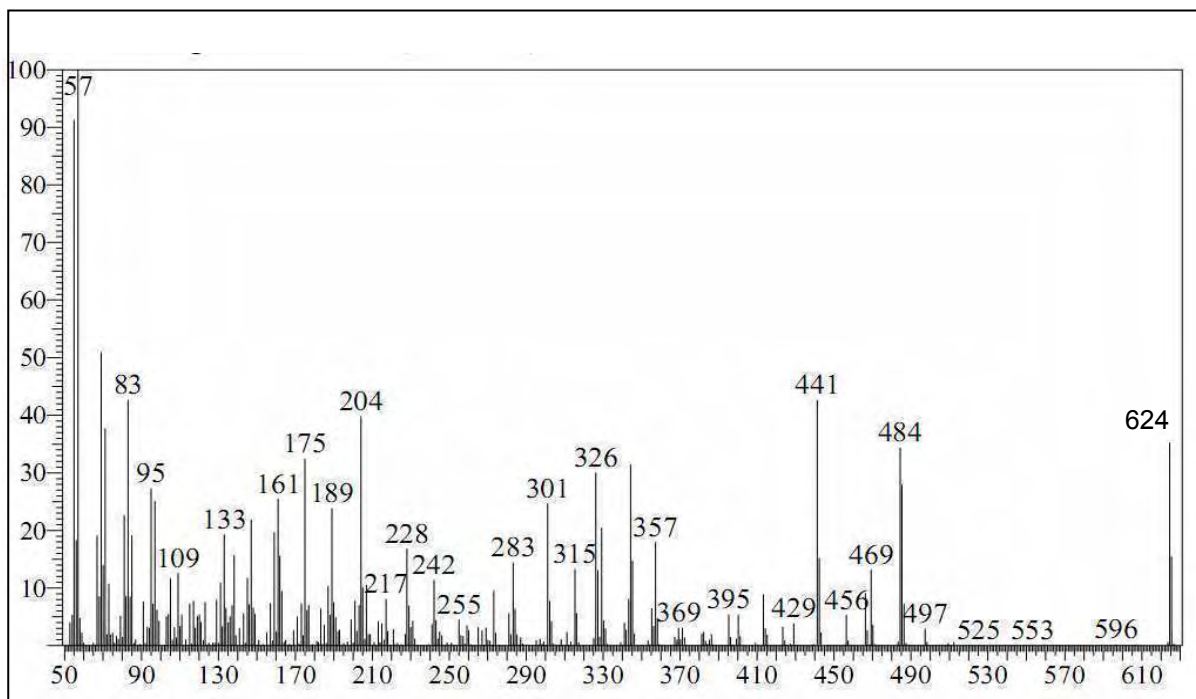


Figura 74 – Espectro de massas da substância **7** em modo de ionização por impacto de Elétron a 70 eV.

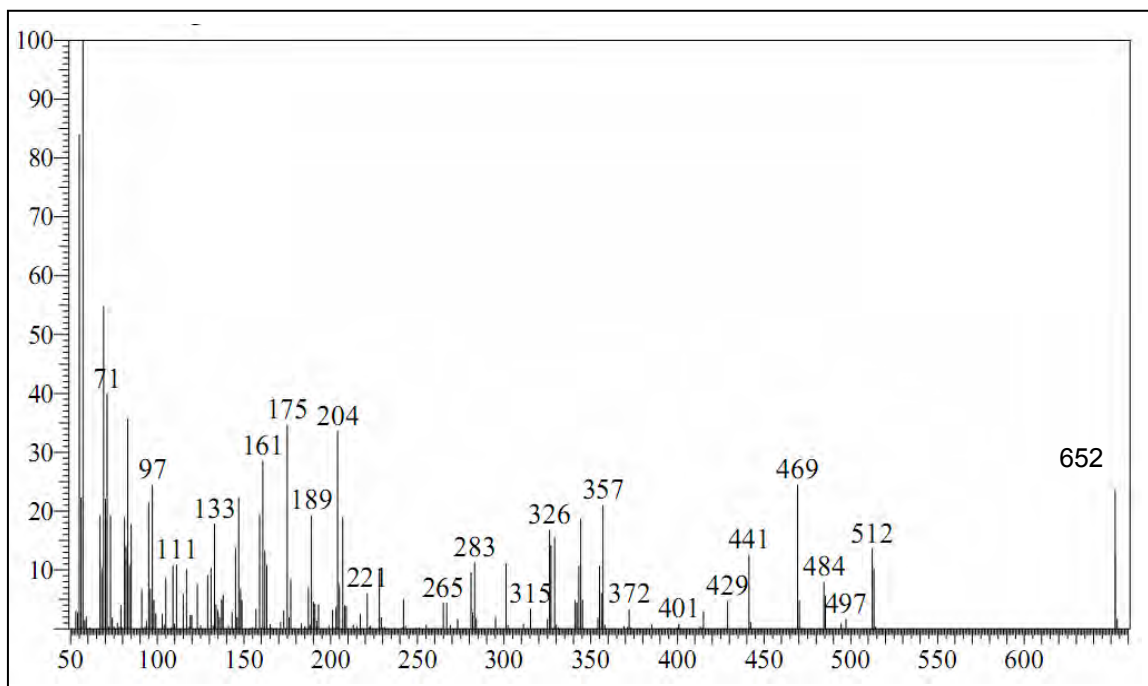


Figura 75 – Espectro de massas da substância **8** em modo de ionização por impacto de elétron a 70 eV.

5.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FARMACOGNÓSTICOS

A análise farmacognóstica se refere aos ensaios necessários para assegurar a qualidade de drogas de origem natural através dos parâmetros de autenticidade, integridade e pureza que, quando possível, encontram-se descritos nas monografias farmacopêicas específicas. Tal condição garante lotes padronizados, tanto da matéria-prima ativa como do medicamento, com concentração constante de substâncias ativas e capazes de promover o mesmo efeito terapêutico (1, 13, 145-148).

Ainda são poucas as monografias farmacopêicas de drogas vegetais brasileiras presentes na Farmacopéia Brasileira IV devido a precariedade de informações científicas (148, 49). Este fato justifica a necessidade de haver maior investigação farmacognóstica para serem propostos parâmetros de qualidade essenciais para a elaboração de monografias de drogas nacionais de importante uso medicinal cuja eficácia e segurança já tenham sido confirmadas.

Na busca deste objetivo é necessário que a droga seja analisada em diferentes locais e épocas do ano procurando verificar se os fatores edáficos, climáticos e sazonais são capazes de alterar demasiadamente os parâmetros farmacognósticos, interferindo na definição dos resultados a serem propostos (17, 150, 151).

Este trabalho se propôs a analisar a raiz de *C. regium* considerando o aspecto sazonal através de amostras coletadas bimestralmente durante o ano de 2008. Sendo assim, as amostras foram coletadas no mesmo local (cerrado nativo do *Campus* III da Uniderp) diminuindo as variáveis externas que pudessem prejudicar a análise sazonal (110, 152). O caráter ontogênico não pôde ser estabelecido visto que *C. regium* é um arbusto que sobrevive a queimadas mantendo um tamanho uniforme entre os indivíduos de um mesmo local.

Foram realizadas as determinações de: características botânicas e organolépticas, distribuição granulométrica, densidade, umidade da raiz fresca, umidade residual, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, *fingerprint* por CCD e CLAE, quantificação de ácido gálico e diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo. Os parâmetros aqui adquiridos podem direcionar a padronização de *C. regium* para uso medicinal.

5.3.1 Características organolépticas e descrição botânica

As raízes analisadas não apresentaram desenvolvimento característico de xilopódio. Mostraram-se pivotantes atingindo mais de 1 m de profundidade e, aproximadamente, 15 cm de largura. A casca, de coloração marron escura, foi retirada durante a lavagem para o processamento da droga segundo a indicação popular. A raiz, desprovida de casca, apresentou sabor adstringente, odor agradável e coloração amarelo-pálida mais clara na região medular (Figura 76).



Figura 76 – Raiz de *C. regium* após coleta, limpeza, retirada da casca e corte manual.

A primeira amostra coletada foi submetida ao corte com facão de poda provocando sutil coloração azulada no material fresco que, após secagem, mostrou-se com grande alteração de cor (marron escuro) (Figura 77). Tal fato, somado com o forte sabor adstringente, caracterizou presença de taninos tornando necessária a rejeição da amostra complexada e o processamento adequado das novas coletas através do corte do material fresco com faca inox (131).

A análise microscópica da raiz fresca e seca não mostrou diferenças significativas entre as amostras. Todas evidenciaram estrutura anatômica secundária onde há região cortical menos desenvolvida contendo bolsas, células parenquimáticas arredondadas ricas em amido, drusas e mucilagens (Figuras 78-84).



Figura 77 – Corte da raiz de *C. regium* com facão de poda provocando complexação de taninos.

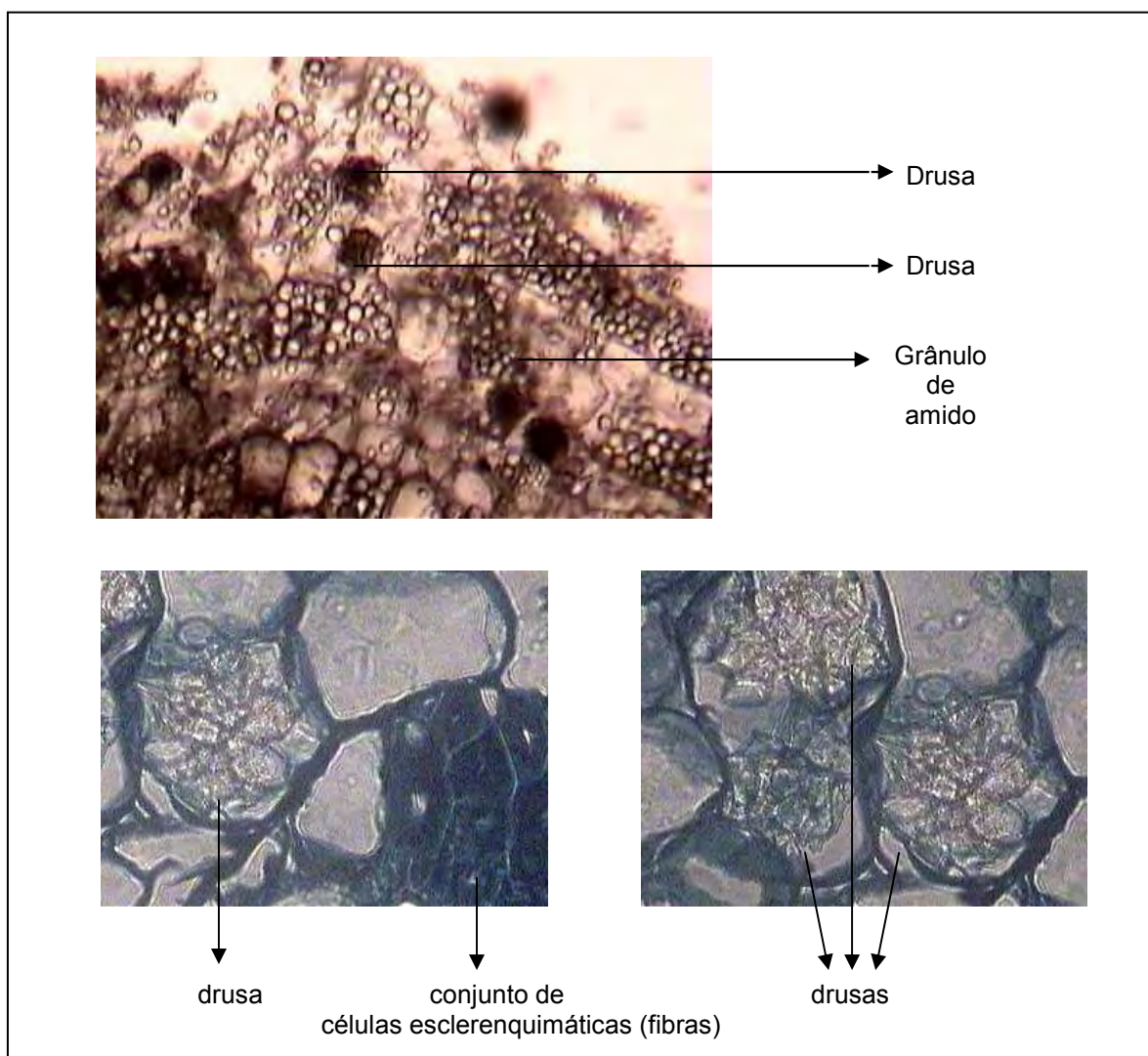


Figura 78 – Secção transversal na região cortical da raiz de *C. regium* evidenciando drusas e células esclerenquimáticas. (A) Lâmina extemporânea sem coloração (M.O. 10x); (B) Lâmina permanente após coloração com safranina-azul de astra (M.O. 40x).

A caracterização das bolsas presentes na região cortical como produtoras de taninos, conforme afirmado por Ritto (23), não pôde ser confirmada em lâminas permanentes visto estarem desprovidas de conteúdo interno (Figura 79). Entretanto, nestas mesmas lâminas, as substâncias fenólicas foram observadas nos feixes do parênquima xilemático (Figura 82). Para identificação inequívoca do conteúdo interno das bolsas, foi realizada análise histoquímica do material vegetal fresco submetido à corte manual. A Figura 80 comprova que as bolsas presentes na região cortical não possuem conteúdo fenólico e sim material oleoso (óleo essencial ou lipídico).

Os grãos de amido são evidentes em toda extensão da raiz, porém, menos abundantes na região floemática. Possuem formato arredondado com hilo central (Figuras 78-84).

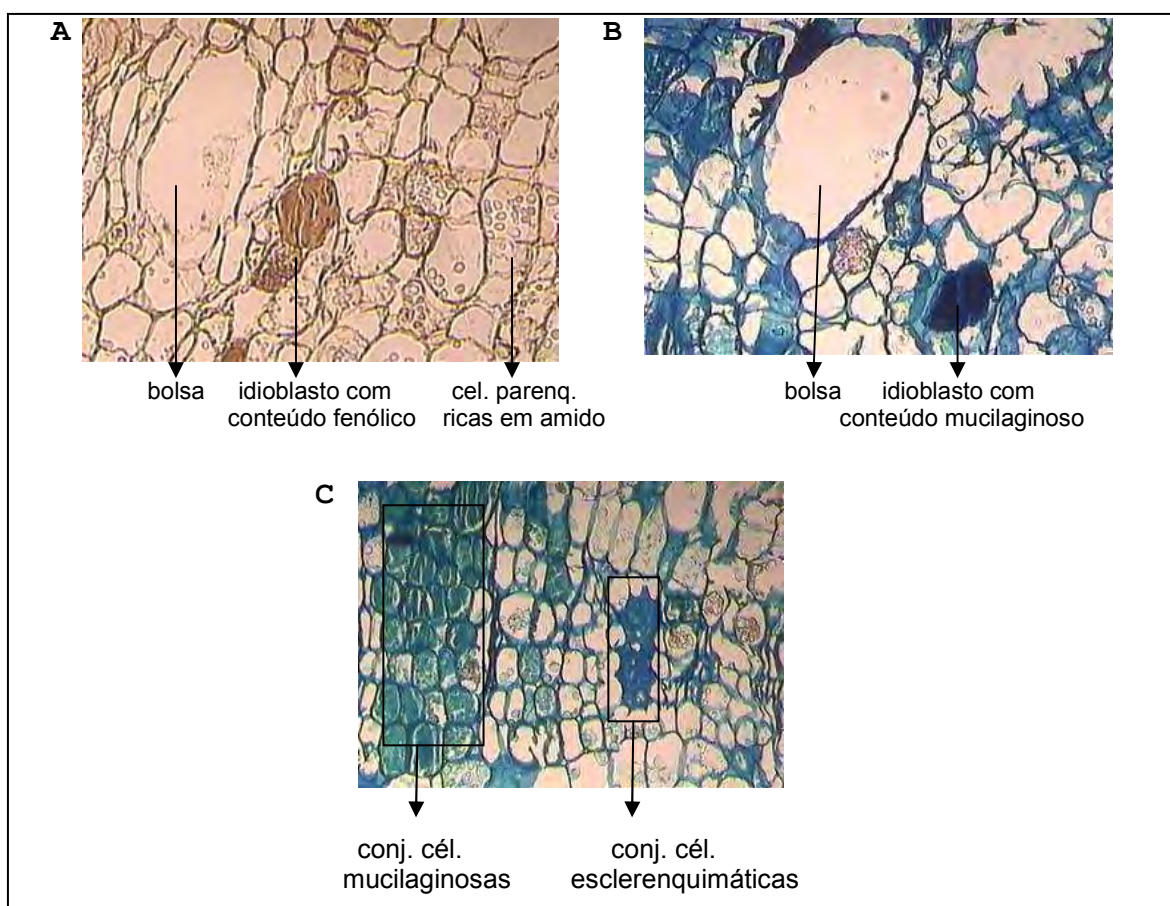


Figura 79 – Secção transversal da região cortical da raiz de *C. regium* (lâminas permanentes) evidenciando grupo de células esclerenquimáticas, bolsa, grãos de amido e células com conteúdo fenólicos e mucilaginoso. (A) Coloração com cloreto férrico; (B e C) Coloração com azul de metileno (M.O. 10x).

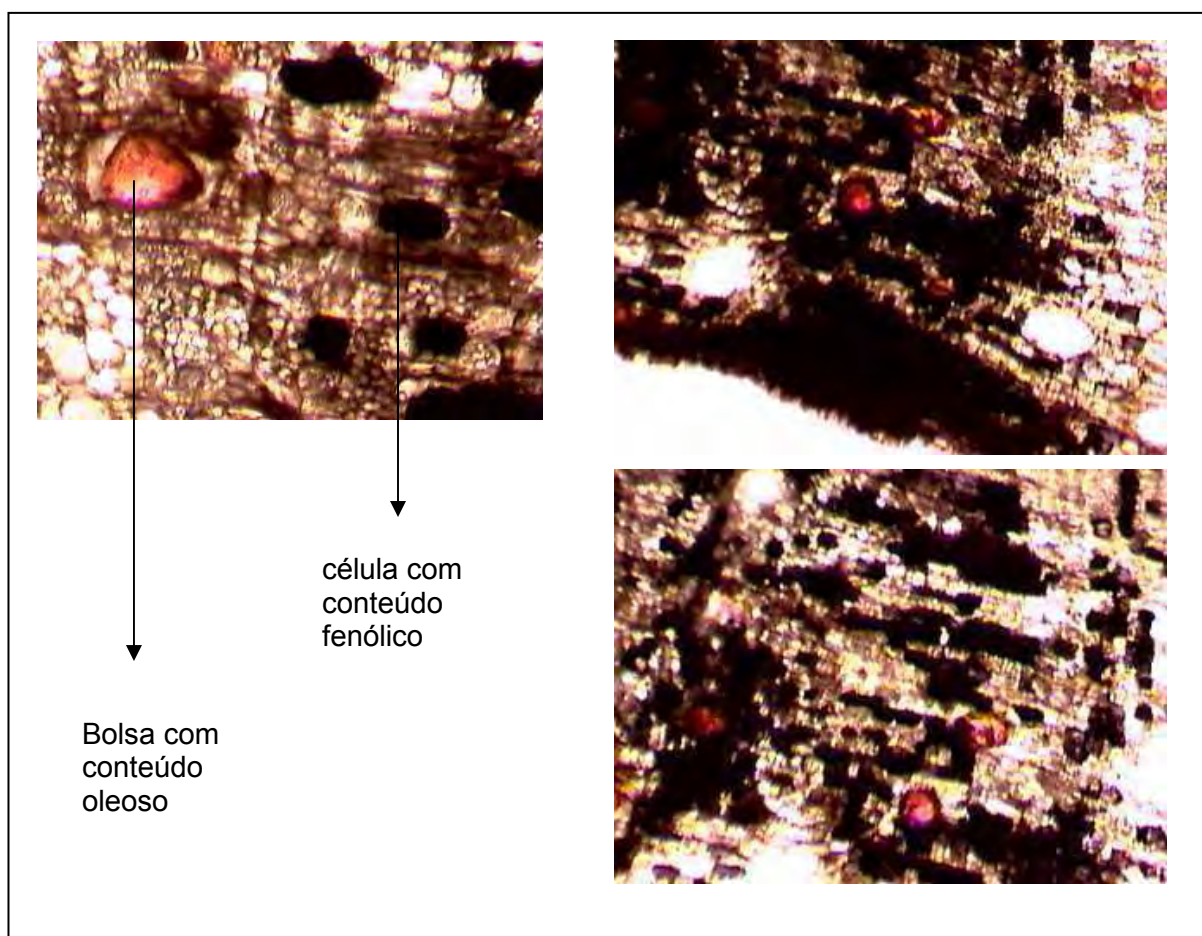


Figura 80 – Secção transversal da região cortical da raiz de *C. regium* (lâminas extemporâneas) evidenciando células com conteúdo fenólico e bolsa oleosa após coloração com cloreto férrico (A) (M.O. 10x).

Todas as características observadas com relação ao floema e xilema se assemelham com as informações descritas por Ritto (23). As células floemáticas mostram formato ogival, com paredes finas e grupo alternado de células esclerenquimáticas de lúmen estreito (fibras) acima das células floemáticas (Figura 81). O corte transversal também mostra área cambial entre os raios medulares com células volumosas, porém, estreitas (Figura 81).

O xilema é mais desenvolvido, rico em tecido parenquimático com grãos de amido e com vasos, prevalentemente, solitários. É dividido por raios formados por até 5 camadas de células parenquimáticas retangulares ricas em conteúdo fenólico (Figuras 82-84).

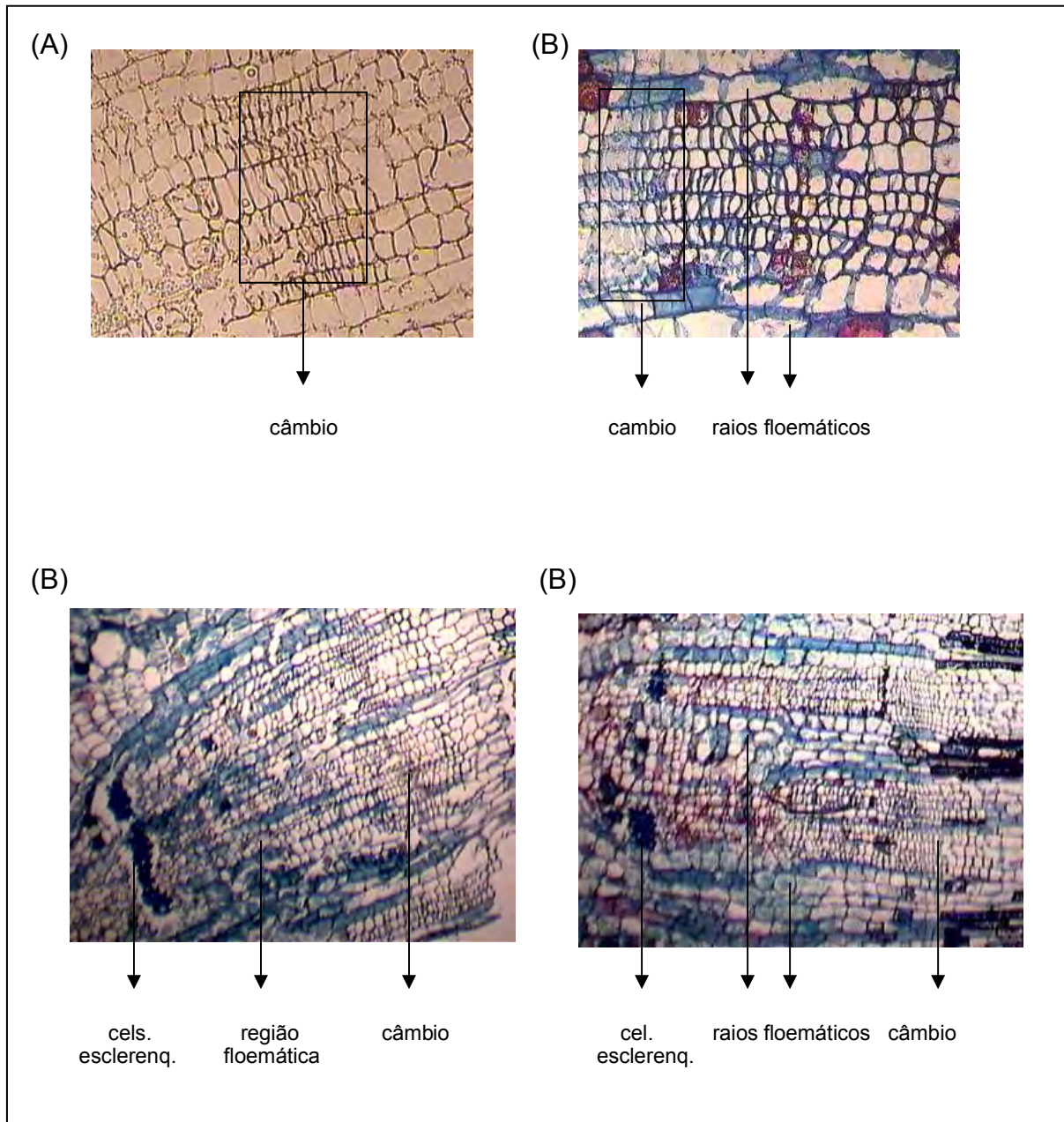


Figura 81 – Secção transversal da região floemática da raiz de *C. regium* (lâmina permanente), próxima ao câmbio, evidenciando células esclerenquimáticas, câmbio e raios floemáticos. (A) Coloração com cloreto férrico; (B) Coloração com safranina-azul de astra (M.O. 4 e 10x).

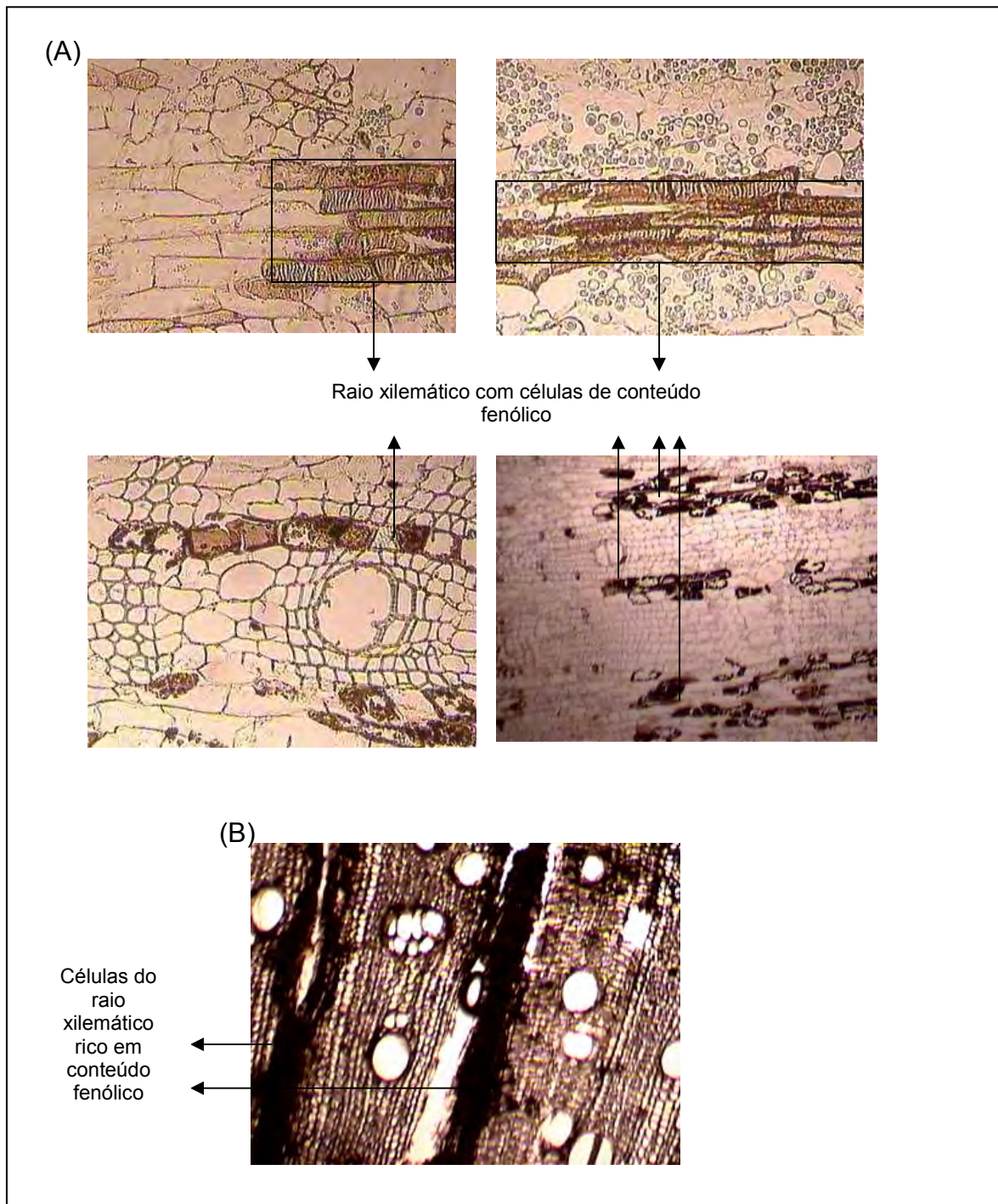


Figura 82 – Secção transversal da região do xilema secundário da raiz de *C. regium* evidenciando células parenquimáticas do raio xilemático com conteúdo fenólico. (A) lâminas permanentes (M.O. 10 e 40 x); (B) corte histológico extemporâneo (M.O. 10 x).

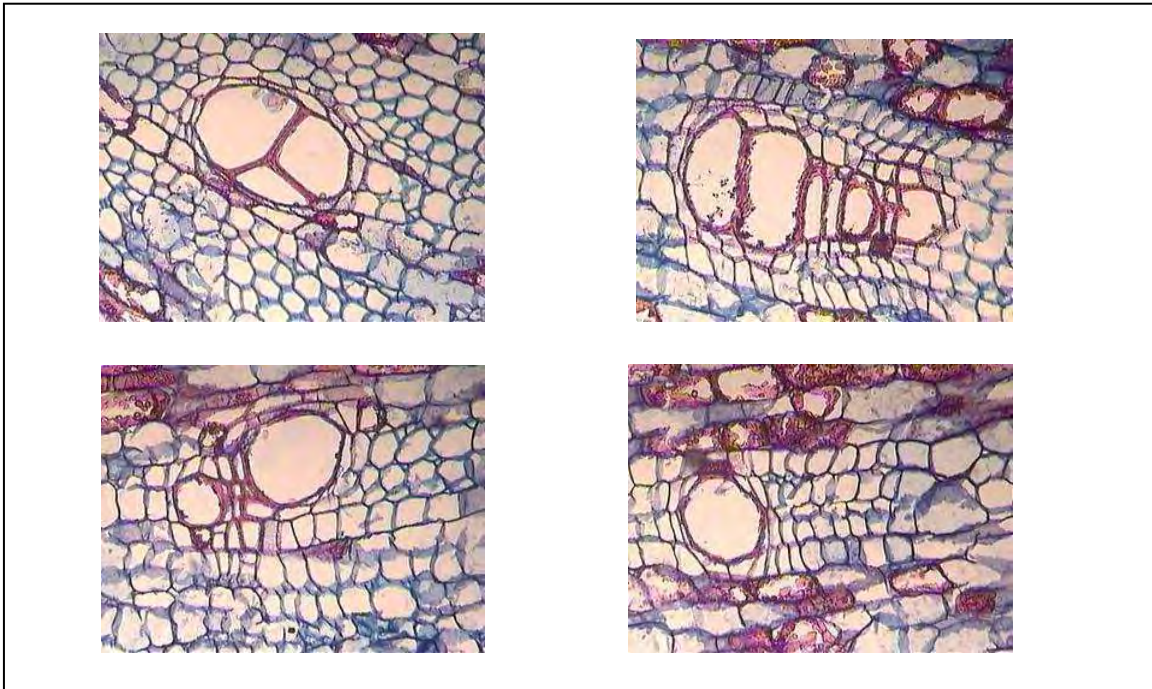


Figura 83 – Secção transversal da região do xilema secundário da raiz de *C. regium* (lâmina permanente) evidenciando vasos solitários e agrupados (M.O. 40x).

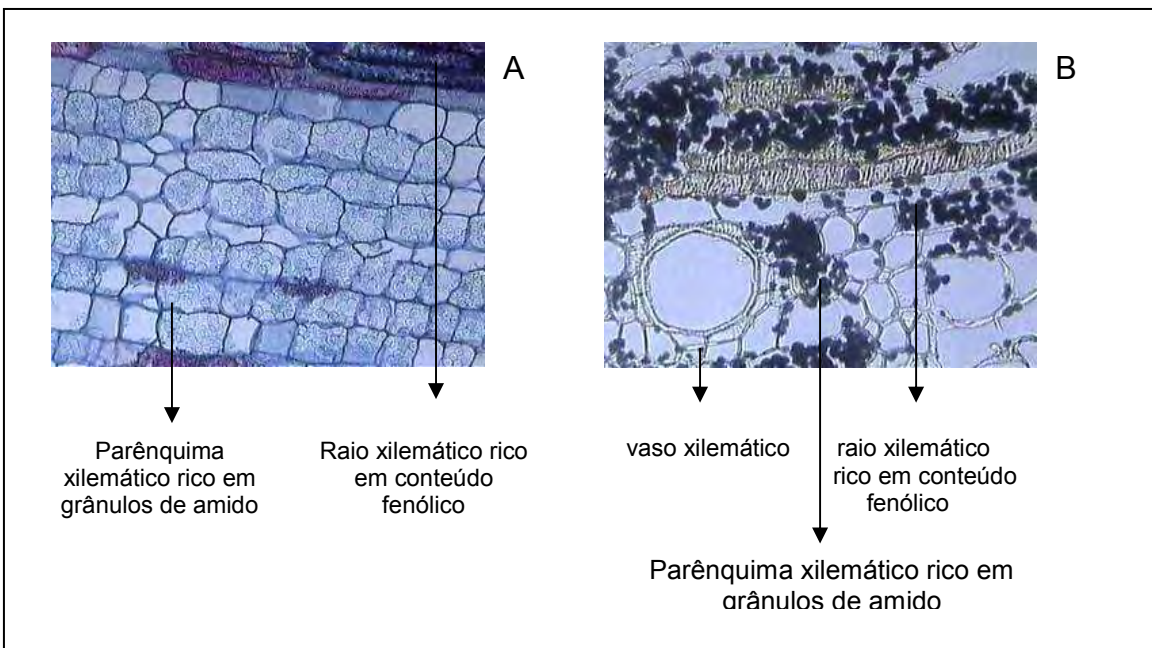


Figura 84 – Secção transversal da região do xilema secundário da raiz de *C. regium* (lâmina permanente) evidenciando células parenquimáticas ricas em amido e células do raio xilemático ricas em conteúdo fenólico. (A) Coloração com safranina-azul de astra; (B) Coloração com lugol (M.O. 40 x).

5.3.2 Parâmetros físico-químicos

5.3.2.1 Distribuição granulométrica, densidade aparente e por compactação

A distribuição granulométrica de *C. regium* em condições de moagem específicas, foi determinada com o objetivo de se conhecer a capacidade física da raiz seca na etapa tecnológica de granulação. Este ensaio foi realizado somente com as amostras coletadas em fevereiro, abril e junho utilizando um jogo formado pelos tamises com abertura de malha 0,840 (20), 0,300 (50) e 0,250 (60) mm.

Os resultados permitiram classificar o pó da raiz de *C. regium* pulverizado em moinho de facas com peneira de 2 mm, como um pó semelhante ao considerado como semi-fino, visto que mais de 40% do pó passou pelo tamis de abertura nominal de 250 μ m (BRASIL, 1988). A classificação farmacopêica identifica o pó semi-fino como aquele que “passa totalmente pelo tamis de 0,355 mm e, no máximo, 40% pelo tamis com malha de 0,180 mm”.

A Tabela 12 e a Figura 85 fornecem as quantidades retidas em cada tamis demonstrando que grande parte das partículas encontra-se na classe granulométrica menor do que 0,250 mm, na proporção de 71,6 (fev), 51,7 (abr) e 72,9 % (jun). O diâmetro médio das partículas foi calculado em 0,256 (fev), 0,349 (abr) e 0,256 mm (jun) fornecendo a média granulométrica de 0,287 (\pm 0,0534) mm.

Tabela 12 – Teor de massa (%) retida e acumulada da raiz seca de *C. regium* pulverizada em moinho elétrico de facas acoplado com tela de 2 mm, coletada nos meses de fevereiro, abril e junho, de 2008

Abertura da malha (mm)	Classe granulométrica (mm)	Abertura média (mm)	Amostras	Fração retida (%)	Fração retida acumulada (%)
0,840 (tamis 20)	0,840 2,000	1,420	Fev	1,96	1,96
			Abr	3,24	3,24
			Jun	3,32	3,32
0,300 (tamis 50)	0,300 0,840	0,570	Fev	21,78	23,74
			Abr	37,74	40,98
			Jun	16,71	20,03
0,250 (tamis 60)	0,250 0,390	0,320	Fev	4,60	28,34
			Abr	7,30	48,28
			Jun	7,00	27,03
Coletor	0,000 0,250	0,125	Fev	71,66	100
			Abr	51,72	100
			Jun	72,97	100

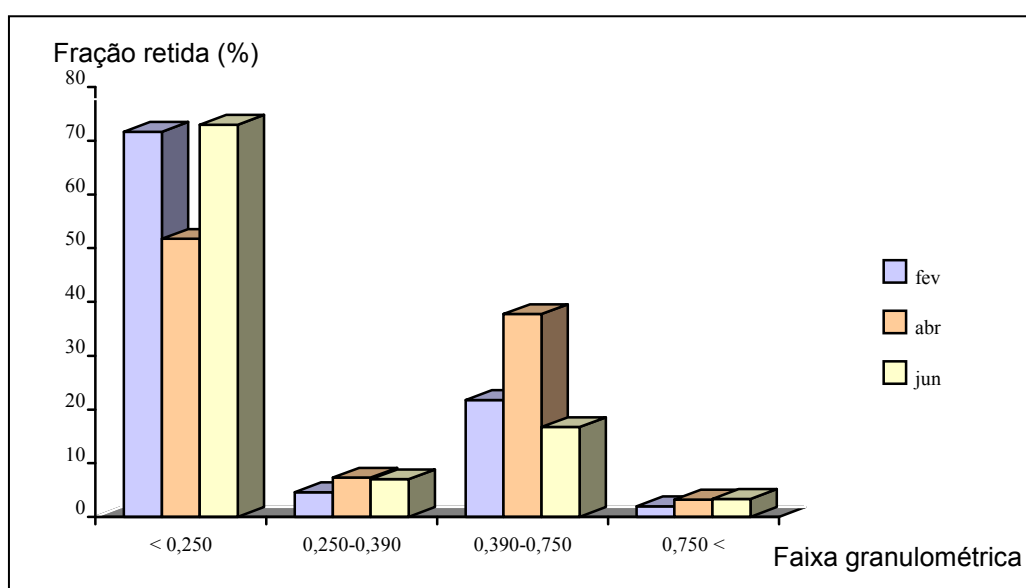


Figura 85 – Distribuição do tamanho das partículas da raiz de *C. regium* pulverizada em moinho de facas com peneira de 2 mm.

A determinação da densidade aparente e por compactação foi realizada com as seis amostras coletadas bimestralmente e forneceu valores semelhantes que atribuíram o resultado médio respectivos de 0,40 (\pm 0,030) g/ mL e 0,62 (\pm 0,050) g/mL. Tais resultados assemelham-se aos reportados por Martins *et al.* (153) que registram a densidade aparente 0,56 g/mL com diâmetro médio das partículas de 174 μ m para a raiz de *Smilax polyintha*. As partes aéreas tendem a possuir menor densidade conforme registrado para *Melampodium dicaricatum* (densidade aparente: 0,22 g/ mL; densidade por compactação: 0,26 g/ mL) (115).

Tabela 13 – Valores da densidade aparente e por compactação da raiz de *C. regium* pulverizada em moinho elétrico de facas acoplado com peneira de 2 mm, coletada nos meses de fevereiro, abril, agosto, outubro e dezembro/ 2008

Amostras	Densidade aparente (g/ mL)	Densidade por compactação (g/ mL)
Fev	0,42 ± 0,010	0,64 ± 0,017
Abr	0,44 ± 0,026	0,67 ± 0,006
Jun	0,41 ± 0,020	0,66 ± 0,015
Ago	0,40 ± 0,000	0,61 ± 0,010
Out	0,35 ± 0,017	0,53 ± 0,011
Dez	0,40 ± 0,005	0,63 ± 0,010
MÉDIA	0,40 ± 0,030	0,62 ± 0,050

O conhecimento sobre as características físicas das drogas vegetais pode levar à obtenção de pós com propriedades tecnológicas adequadas capazes de favorecer, principalmente, as técnicas extrativas. O tamanho, formato, densidade, área superficial e porosidade são características que influem na capacidade de extração e absorção de umidade do pó (13, 145, 151, 154, 155).

List e Schmidt (13) e Sharapin (3, 155) informaram que pós de maior tamanho e com boa molhabilidade favorecem as extrações por maceração e percolação. A presença de partículas muito finas e densas dificulta a percolação e maceração por concrecimento provocando a formação de canais preferenciais (percolação) e prejudicando a eficiência de filtração (maceração) (3, 145, 147, 154, 155). Neste sentido, para serem submetidas a processos extrativos, as drogas devem ser pulverizadas de forma a serem obtidos pós “moderadamente grosso ou semi-fino” ajustando-se o equipamento de moagem de acordo com a natureza física da droga, ou incorporando de material inerte e volumoso, como palha de arroz, para que o pó seja extraído com maior eficiência (3, 155).

Para partes vegetais lenhosas como entrecasca, casca, raiz, rizomas e sementes, é indicado o corte semi-fino em moinho adequado para que a granulometria se mantenha entre 0,5 a 5 mm, produto classificado como pó grosso ou moderadamente grosso pela Farmacopéia Brasileira IV (72, 145, 147, 154).

Neste contexto, os resultados aqui apresentados indicam que a raiz de *C. regium* apresenta boa capacidade de pulverização devendo haver ajuste do equipamento de moagem para que a droga em pó possua granulometria maior do que 0,285 mm quando o interesse for utilizá-la em processos extrativos com finalidade tecnológica.

5.3.2.2 Umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido

Os resultados indicaram que a raiz de *C. regium* apresenta grande teor de água com valor médio de 71,27 ($\pm 4,24$) que variou entre 65,95 a 73,1% (Tabela 14). Estes resultados reforçam os dados da literatura que atribuem características xerofíticas da raiz (xilopódio) capacitando esta espécie para reserva de água e sobrevivência no solo árido e no clima quente do cerrado (112). Em relação às condições tecnológicas de produção, este resultado direciona a quantidade de material fresco que deve ser coletado para a produção da droga vegetal.

Os teores de umidade das drogas processadas variaram entre 7,3 a 9,7% (média de $8,48 \pm 0,92$) demonstrando que a capacidade da droga absorver umidade não possibilita o crescimento de microorganismos que ocorre, conforme Oliveira *et al.* (110) e List e Schmidt (13), em material com umidade acima de 12%. Nas plantas farmacopêicas é estabelecido teores de umidade que variam entre 5 a 16% dependendo da natureza higroscópica da droga (Tabela 14, Quadro 3).

O teor de cinzas totais estabelece a quantidade de substâncias inorgânicas não voláteis obtidas por incineração representando a soma de material inorgânico produzido pela espécie (cinzas intrínsecas, fisiológicas) com o aderido à droga pelo ambiente (cinzas extrínsecas, areia, pedra) obtidas, geralmente, pelo mal processamento do farmacógeno após a coleta. Este último parâmetro é determinado pelo ensaio de cinzas insolúveis em ácido sendo aceito maior teor para drogas farmacopêicas que são raízes e cascas do caule (Quadro 2) (72, 146, 148, 149). Vale comentar que, a quantidade de cinzas fisiológicas (diferença entre o valor de cinzas totais e cinzas insolúveis) é indicativa de autenticidade da droga.

As raízes de *C. regium* analisadas apresentaram os teores de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido que variaram, respectivamente, entre 2,52 ($\pm 0,02$) a 3,94 ($\pm 0,71$) % e 0,00 a 0,26 ($\pm 0,07$)%. Estes resultados permitem concluir que a raiz de *C. regium* pode produzir até 4% de material inorgânico fisiológico sendo praticamente inexistente a capacidade de aderência de material extrínseco (Tabela 14).

Os resultados de umidade da droga e cinzas totais aqui adquiridos diferenciam-se de Ritto (23) que descreve os valores respectivos de 15,1 e 2,08%, para raiz coletada no cerrado do município de Leme/ SP. O autor realizou quatro coletas nos

anos de 1992 e 1995 e não especificou qual material foi utilizado para estes ensaios. A diferença substancial no valor de umidade obtida por este trabalho e o apresentado por Ritto (23) pode ser atribuída a fatores relacionados com o ambiente e/ou com o processamento da droga (152, 145, 147).

Tabela 14 – Teor de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido para raiz de *C. regium* coletada nos meses de fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro/ 2008

Amostras	Parâmetros físico-químicos (%)			
	Umidade da raiz fresca	Umidade da droga	Cinzas totais	Cinzas insol.
Fev	71,8 ± 0,54	7,3 ± 0,26	3,0 ± 0,02	0,15 ± 0,02
Abr	71,2 ± 1,15	9,7 ± 0,43	3,6 ± 0,07	0,26 ± 0,07
Jun	68,8 ± 0,40	9,34 ± 0,31	2,52 ± 0,02	0,00 ± 0,00
Ago	78,7 ± 0,88	7,74 ± 0,17	3,07 ± 0,04	0,00 ± 0,00
Out	71,21 ± 0,81	8,57 ± 0,71	3,94 ± 0,71	0,05 ± 0,07
Dez	65,95 ± 0,51	8,25 ± 0,23	2,37 ± 0,05	0,06 ± 0,02
Média	71,27 ± 4,24	8,48 ± 0,92	3,08 ± 0,60	0,08 ± 0,10

Quadro 2 – Teor de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis de algumas drogas farmacopêicas

Espécie	Parte	Teor máximo aceitável (%)		
		Umidade	Cinzas totais	Cinzas insol.
<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	raiz	n/c	6	3
<i>Cinchona pubescens</i>	casca	10	5	n/c
<i>Foeniculum vulgare</i>	Fruto	10	10	n/c
<i>Gentiana lutea</i>	Raiz	5	6	n/c
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Raiz	10	7	n/c
<i>Hamamelis virginiana</i>	Folha	5	7	2
<i>Hydrastis canadensis</i>	Raiz	10	8	n/c
<i>Malva sylvestris</i>	Folha	16	16	n/c
<i>Peumus boldus</i>	Folha	5	10	6
<i>Matricaria recutita</i>	inflorescência	n/c	14	n/c
<i>Pimpinella anisum</i>	Fruto	7	12	n/c
<i>Rhamnus pursiana</i>	Casca	12	6	2
<i>Valeriana officinalis</i>	Raiz	n/c	15	7

n/c: não consta. Fonte: Farmacopéia Brasileira 4ª edição.

5.3.2.3 Perfil cromatográfico (*fingerprint*)

O *fingerprint* traduz a impressão digital química da matriz possibilitando verificar a identidade do produto vegetal bem como a possibilidade de adulterações e falsificações. É obtido através de análise cromatográfica por diferentes técnicas dependendo da classe química prevalente na matriz e do objetivo do experimento (quali, semi-quantitativo ou quantitativo). Deve apontar, prioritariamente, o(s) marcador(es) químico(s) sempre acompanhados de outros metabólitos secundários quimicamente semelhantes e presentes na matriz vegetal analisada, passíveis de visualização no mesmo sistema cromatográfico. Forma um desenho único em que a proporção dos seus componentes deve ser constante ou variar em faixas estreitas, mesmo que as substâncias ativas ou marcadoras não sejam conhecidas. Desta forma, o *fingerprint* é uma ferramenta imprescindível para se conhecer a autenticidade do material vegetal bem como sua integridade química, permitindo a obtenção de produtos quimicamente padronizados (107, 146, 148, 156).

O fracionamento químico realizado com a raiz de *C. regium* evidenciou que os metabólitos secundários prevalentes e potencialmente ativos são polifenóis passíveis de serem observados por CCD e CLAE em sistemas úteis para migração de substâncias polares e detecção de cromóforos. Os compostos majoritários isolados, ácido gálico, diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo e ácido elágico, foram utilizados como padrão (marcadores) e direcionaram os métodos cromatográficos.

Entre os sistemas cromatográficos testados para análise por CCD, as melhores resoluções foram obtidas em cromatoplasmas de sílica gel utilizando os eluentes clorofórmio:ácido acético:metanol:água (64:32:12:8) e acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (100:11:11:26), reveladas com NP/PEG ou cloreto férrico (Figuras 86 e 87). Por esse ensaio foram analisados o extrato hidroetanólico 10% utilizando o álcool 70% como solvente extrator, e a fração acetato de etila obtida pela partição do extrato hidroalcoólico. A extração seletiva do extrato hidroalcoólico com acetato de etila teve como objetivo diminuir interferentes e intensificar a concentração dos marcadores.

O extrato hidroetanólico e a fração acetato de etila, eluídos com clorofórmio:ácido acético:metanol:água (64:32:12:8) e revelados com NP/ PEG, mostraram sobreposição do ácido gálico (fluorescência azul) com o diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo (fluorescência amarela), em Rf próximo a 0,6, onde houve predominância da coloração amarela do flavonóide mascarando a presença de ácido gálico (Figura 86). Melhor deslocamento destes metabólitos foi obtido realizando eluição com acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (100:11:11:26) onde o ácido gálico e diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo mostraram fatores de retenção de 0,93 e 0,70, respectivamente (Figura 87).

Utilizando os eluentes acima citados, o metabólito secundário inédito diidrokaempferol-3-O- β -(6''galoil)-glicopiranosídeo foi observado com coloração laranja escura logo abaixo do diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo (Figuras 86 e 87). Já o ácido elágico forneceu mancha larga de fluorescência azul não observada nas amostras (Figuras 86 e 87). É importante comentar que a presença deste marcador está associada com a hidrólise dos taninos elágicos e, portanto, a sua presença pode sugerir a inadequação do material vegetal (droga, produto extrativo, entre outros) acarretada pela degradação química dos taninos elágicos (131).

A revelação das cromatoplasmas com cloreto férrico mostrou detecção mais sutil do que com NP/ PEG identificando todos os polifenóis do extrato hidroalcoólico e da fração acetato de etila com coloração azul (107, 131). Dentre os polifenóis revelados, o diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo e o diidrokaempferol-3-O- β -(6''galoil)-glicopiranosídeo apresentaram, inicialmente, cor rósea, podendo ser diferenciados dos outros polifenóis das amostras de *C. regium*.

A detecção dos marcadores foi semelhante entre o extrato hidroalcoólico e a fração acetato de etila, mostrando que a extração seletiva por partição não é necessária.

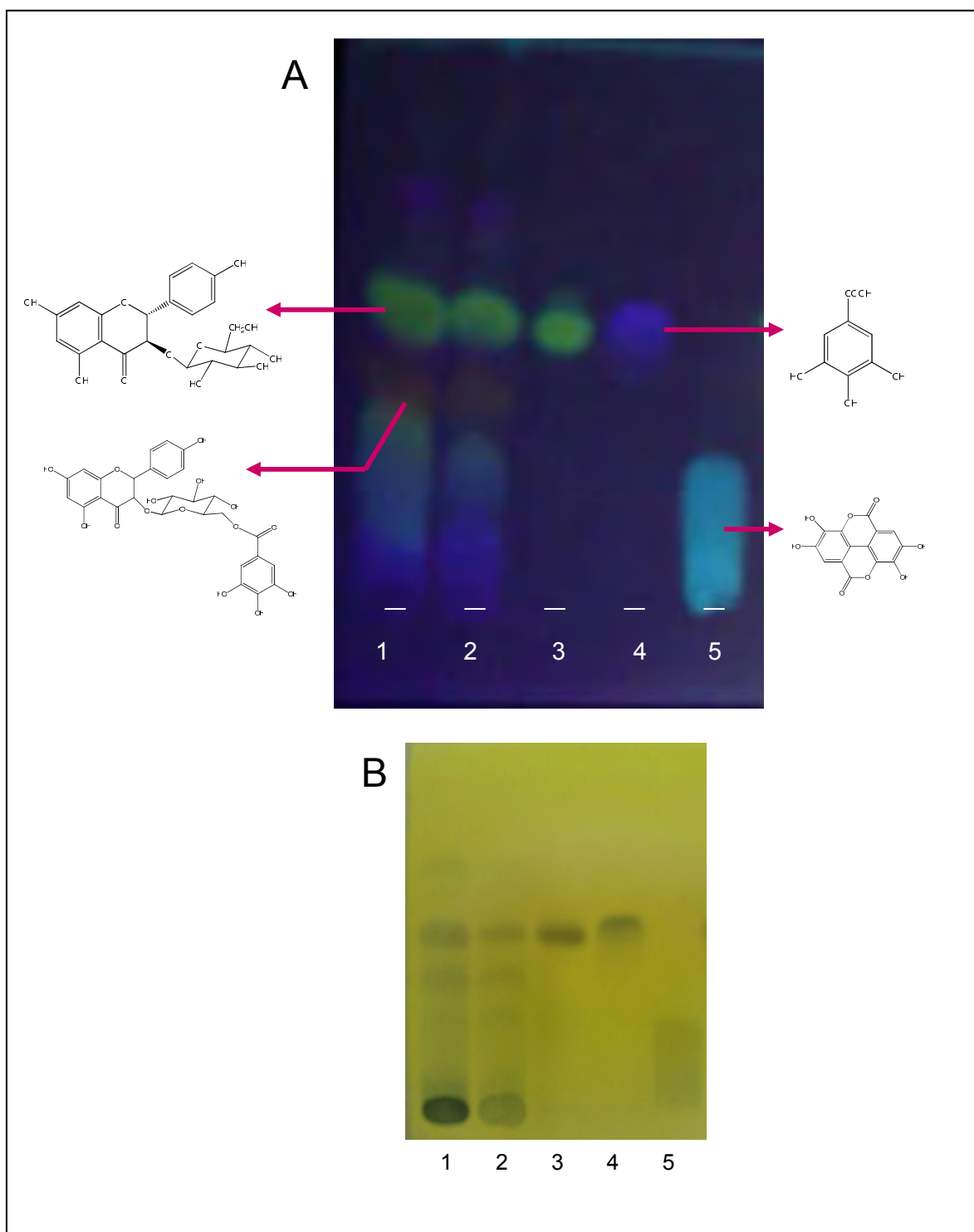


Figura 86 – Perfil cromatográfico por CCD da raiz de *C. regium*, empregando eluição com clorofórmio:ácido acético:metanol:água (64:32:12:8) e revelação com NP/PEG (A) e cloreto férrico (B). Amostras: extrato hidroalcoólico (1); fração acetato de etila (2); diidrokaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo; ácido gálico (4); ácido elágico (5).

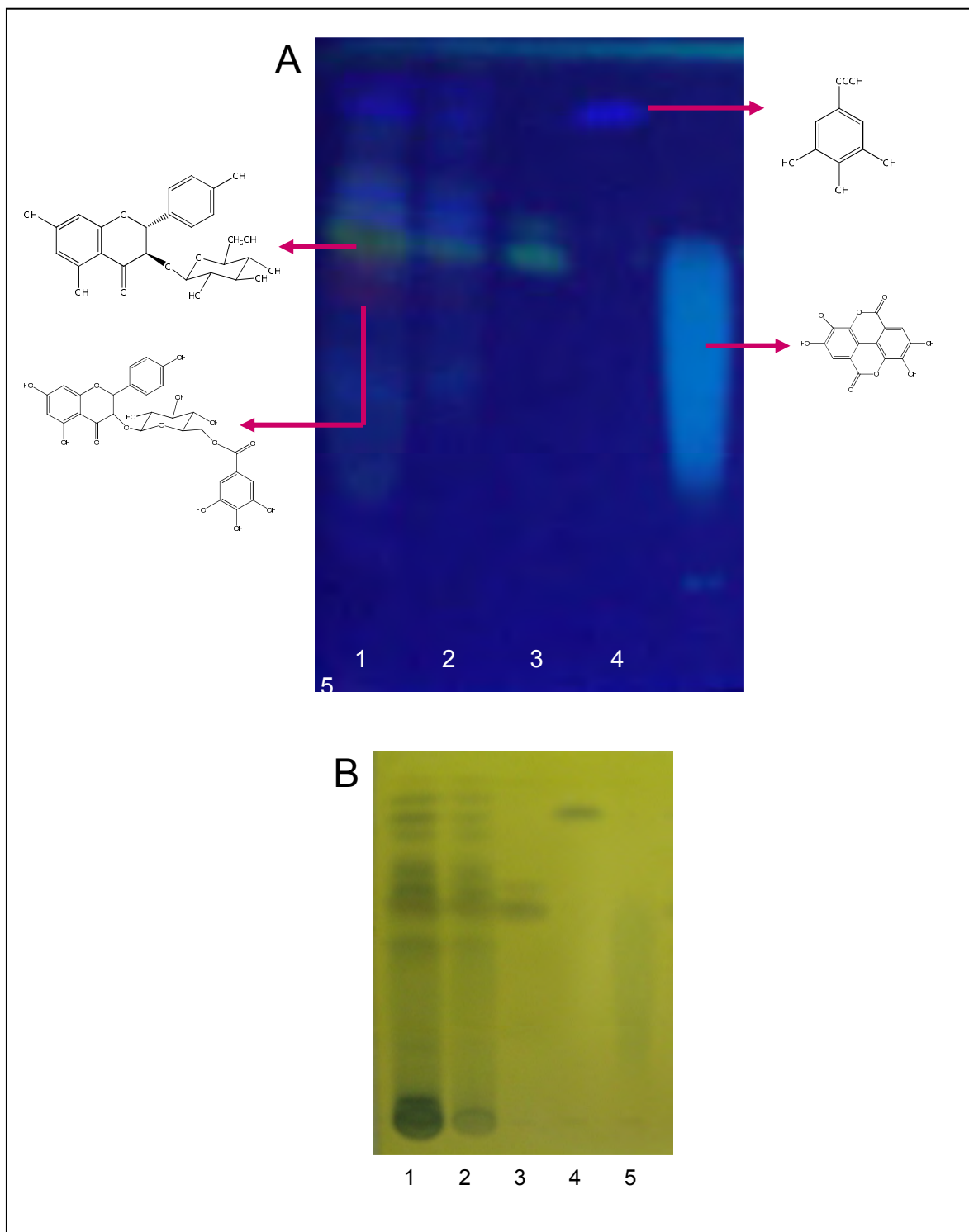


Figura 87 – Perfil cromatográfico por CCD da raiz de *C. regium*, empregando eluição com acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (100:11:11:26) e revelação com NP/PEG (A) e cloreto férrico (B). Amostras: extrato hidroalcoólico (1); fração acetato de etila (2); diidrokaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo; ácido gálico (4); ácido elágico (5).

A busca pelo *fingerprint* por CLAE foi realizada em fase reversa com detecção UV/Vis e DAD, utilizando eluentes ácidos em modo isocrático e gradiente. O estudo analítico de polifenóis simples e flavônicos utilizando CLAE acoplada à detecção UV/Vis é extensamente reportada na literatura (134, 144, 157). Conforme Souza (158), Govindarajan et al. (157) e Rocha (148), este método mostra-se versátil e preciso para análise de flavonóides, especialmente, quando acoplado à detecção com rede de diodos (*diode array detector*, DAD).

Os cromatogramas obtidos por CLAE-UV ou CLAE-DAD permitem visualizar somente substâncias com grupos cromóforos, ou seja, grupos capazes de sofrer transições eletrônicas provocadas pela passagem de elétrons de um orbital ligante para um antiligante (instável) (132, 159, 160). A capacidade cromofórica de galatos e flavonóides se deve às duplas conjugadas do(s) anel(is) benzênico(s) permitindo, facilmente, o deslocamento eletrônico do orbital molecular pi ligante para o orbital pi antiligante.

O padrão espectral de absorção na região do UV/Vis de diferentes flavonóides e compostos fenólicos simples (fenilpropanos, derivados do ácido gálico e outros) são amplamente caracterizados pela literatura, inferindo sobre o tipo de esqueleto fundamental bem como sobre o grau de substituição (161). As Figuras 88 e 89 ilustram espectros de absorção UV/Vis de alguns ácidos fenólicos e flavonóides de ampla distribuição na natureza.

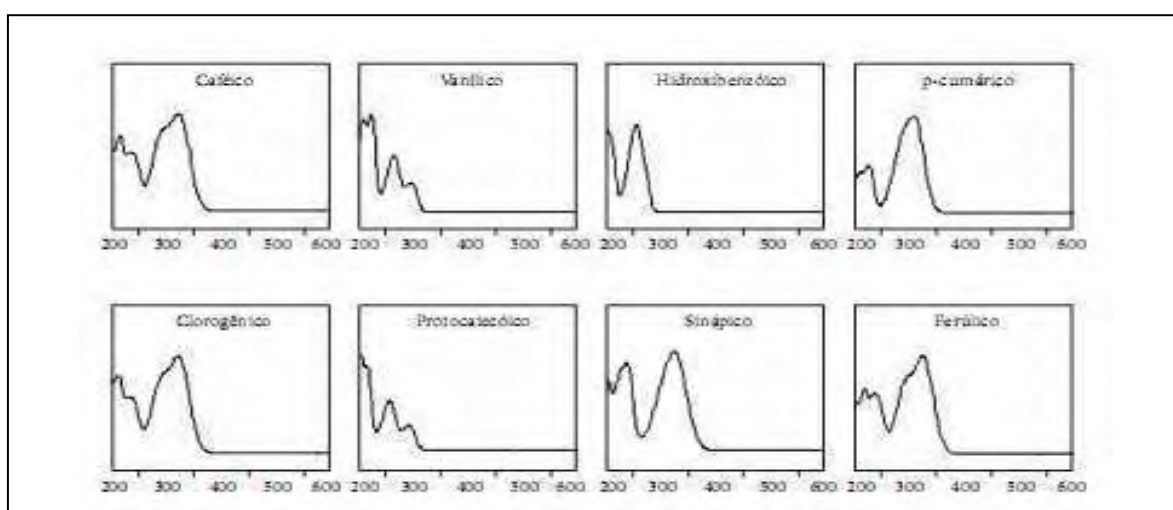


Figura 88 – Espectros de absorção na região UV/Vis (200-600 nm) de alguns padrões de ácidos fenólicos comumente presentes em plantas medicinais. Fonte: Mira et al. (162).

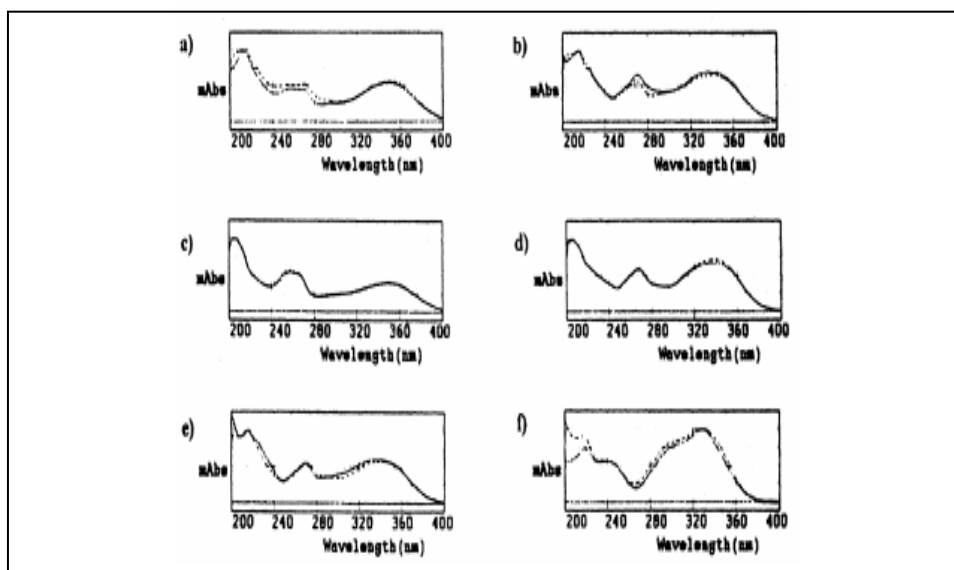


Figura 89 - Espectros de absorção na região UV/Vis (200-400 nm) de alguns padrões de flavonóides e do ácido clorogênico. (a) orientina; (b) vitexina 2-O-ramnosídeo; (c) quercitrina; (d) apigenina 7-O-glicosídeo; (e) vitexina; (f) ácido clorogênico. Fonte: Paiva *et al.* (162).

O sistema de detecção por rede de diodos (DAD) possibilita a aquisição dos espectros de absorção na região do UV/Vis das substâncias separadas pela CLAE. Apesar de diferentes substâncias apresentarem o mesmo grupo cromóforo e, portanto, a mesma capacidade de absorção de luz, o espectro de absorção molecular na região do UV/Vis associado com o tempo de retenção são indicativos importantes para identidade da molécula detectada pelo sistema CLAE-DAD.

No que se refere aos sistemas eluentes apropriados para análise de substâncias fenólicas por CLAE em fase reversa, a literatura indica o uso de misturas ácidas. Neste contexto, Souza (158) informa que misturas de metanol e ácido fosfórico 1% (v/v) ou metanol e ácido acético 1% (v/v) são eluentes comuns para separação de flavonóides em coluna de fase reversa (Spherical C18). Estas informações são reforçadas por Govindarajan *et al.* (157), que indicam haver uso freqüente de eluição binária com água ácida e solvente orgânico polar (metanol ou acetonitrila) em sistema de fase reversa (colunas C18) e detecção por DAD, para análise de produtos vegetais com marcadores fenólicos.

Inicialmente, a análise cromatográfica da raiz de *C. regium* foi realizada em modo isocrático e detecção UV/Vis com comprimento de onda fixo, objetivando

estabelecer um perfil cromatográfico por um método mais simples que possibilitasse a análise em laboratórios menos equipados. A melhor resolução para este sistema foi obtida com metanol:ácido fosfórico 0,16 M (1:1), fluxo de 1 mL/ min e detecção em 362 nm, fornecendo resultado parcialmente útil para a observação do diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo (Tr 4,8 min) e do ácido elágico (Tr 6,8 min). O ácido gálico não apresentou retenção na fase estacionária (Tr 2,3 min) além de ser visualizado em outro canal de detecção (254 nm) (Figuras 90 e 91). A baixa resolução do cromatograma, com sinais sobrepostos ao flavonóide majoritário e a ineficiência na migração do ácido gálico, indicou que o método isocrático em fase reversa é insatisfatório para análise química da raiz de *C. regium*.

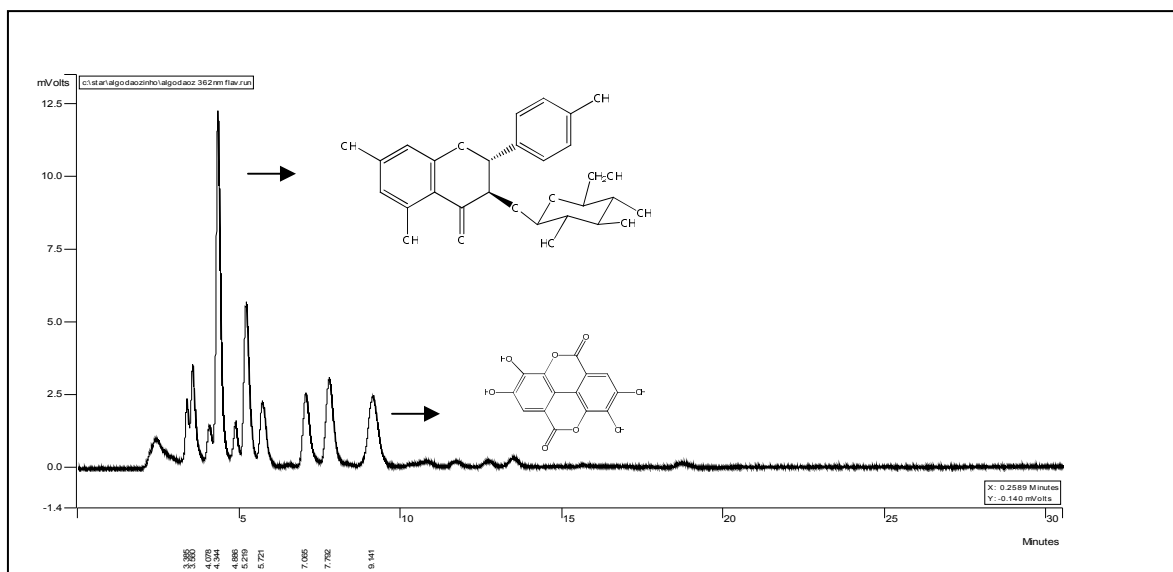


Figura 90 – Perfil cromatográfico por CLAE-UV/Vis do extrato hidroalcoólico da raiz de *C. regium*, empregando coluna C-18, mistura de metanol:ácido fosfórico 0,16 M (1:1), fluxo de 1 mL/ min. e detecção em 362 nm.

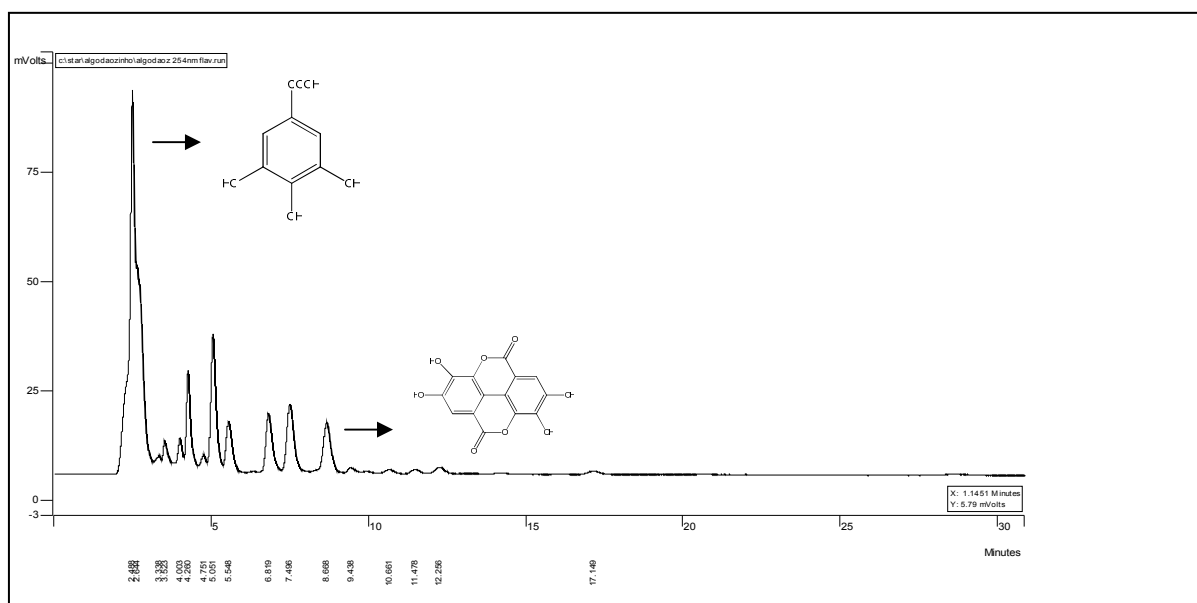


Figura 91 – Perfil cromatográfico por CLAE-UV/Vis do extrato hidroalcoólico da raiz de *C. regium*, empregando coluna C-18, mistura de metanol:ácido fosfórico 0,16 M (1:1), fluxo de 1 mL/ min. e detecção em 254 nm.

A otimização do experimento foi viabilizada por eluição em gradiente e detector DAD, onde a melhor resolução cromatográfica do extrato aquoso (infuso) foi fornecida com gradiente linear de água (eluyente A) e metanol (eluyente B), ambos com 1% e ácido acético, conforme: 0-10% em 3 min; 10-35% de 3 a 10 min; 35-60% de 10-40 min e 60-100% de 40-43 min (Figura 92). Por esse sistema, os padrões isolados de ácido gálico, diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo e ácido elágico foram identificados nos tempos de retenção de 10 (266 e 294 nm), 26 (294 nm) e 35 min (266, 294 e 360 nm) (Figura 93).

A análise dos espectros de absorção na região do UV/Vis fornecidos pelo detector DAD permitiu constatar a natureza química de todos os sinais, conforme ilustrado na Figura 94, mostrando que a natureza fenólica da maioria dos picos com tempo de retenção abaixo de 25 min possuem grupo galoila enquanto que, os sinais entre 26-30 min e 32-39 min corresponderam à flavanonas e derivados do ácido elágico, respectivamente.

Dentre as substâncias com tempo de retenção menor do que 25 min houve diferenciação do espectro de absorção apenas dos picos em 15,55 min, 22,15 e 22,72, ou seja, todos os outros espectros assemelharam-se ao ácido gálico. O perfil espectral da substância com tempo de retenção de 15,55 min sugeriu sua

identidade como sendo o ácido protocatecico e as duas outras substâncias apresentaram perfil espectral de flavanonas (161, 162).

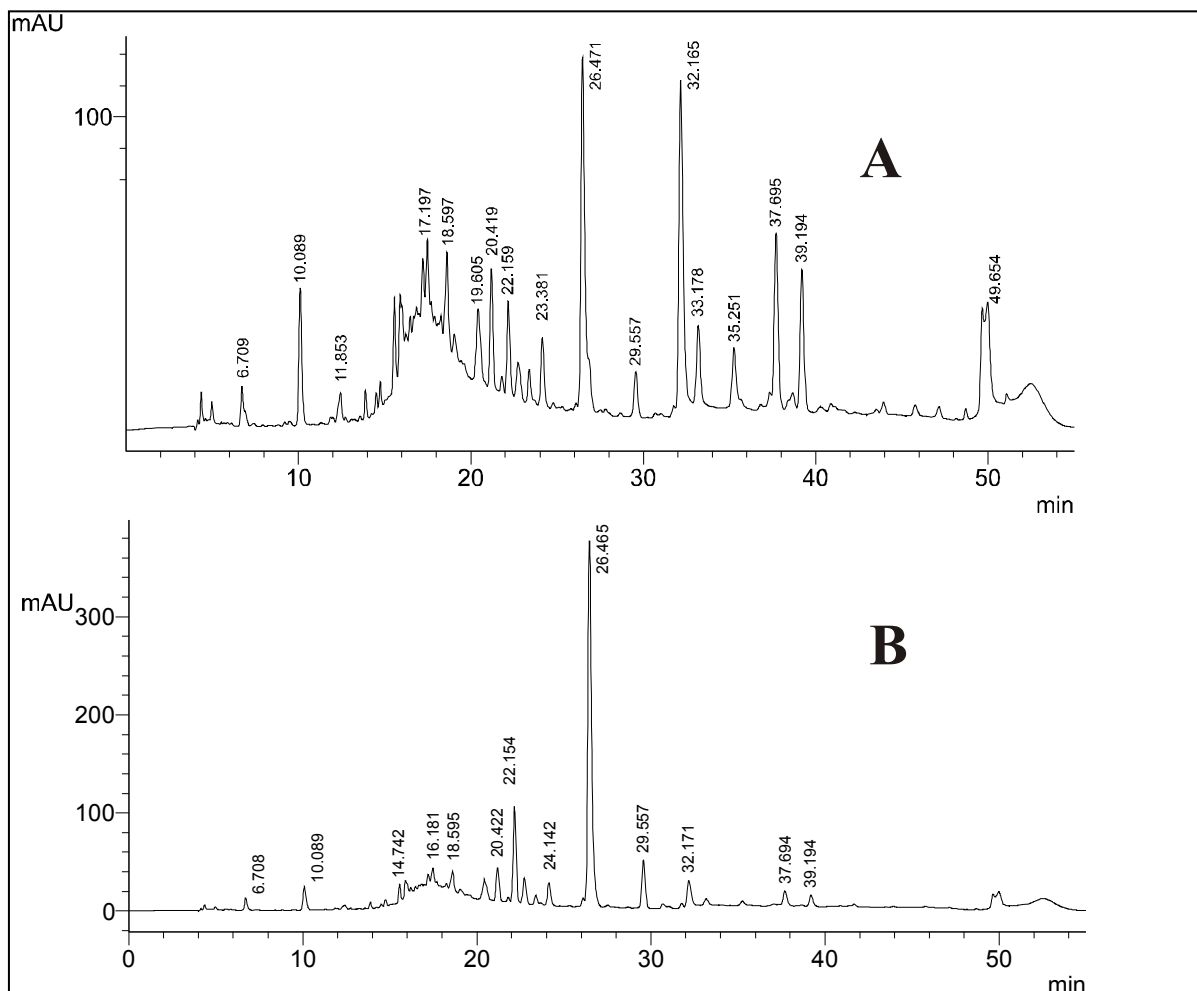


Figura 92 – Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do infuso aquoso da raiz de *C. regium* empregando coluna C-18; eluição em gradiente com água e metanol, ambos com 1% de ácido acético (gradiente de B: 0-10% em 3 min; 10-35% de 3 a 10 min; 35-60% de 10-40 min e 60-100% de 40-43 min), fluxo 0,8 mL/ min nos canais de detecção de 266 nm (A) e 294 nm (B).

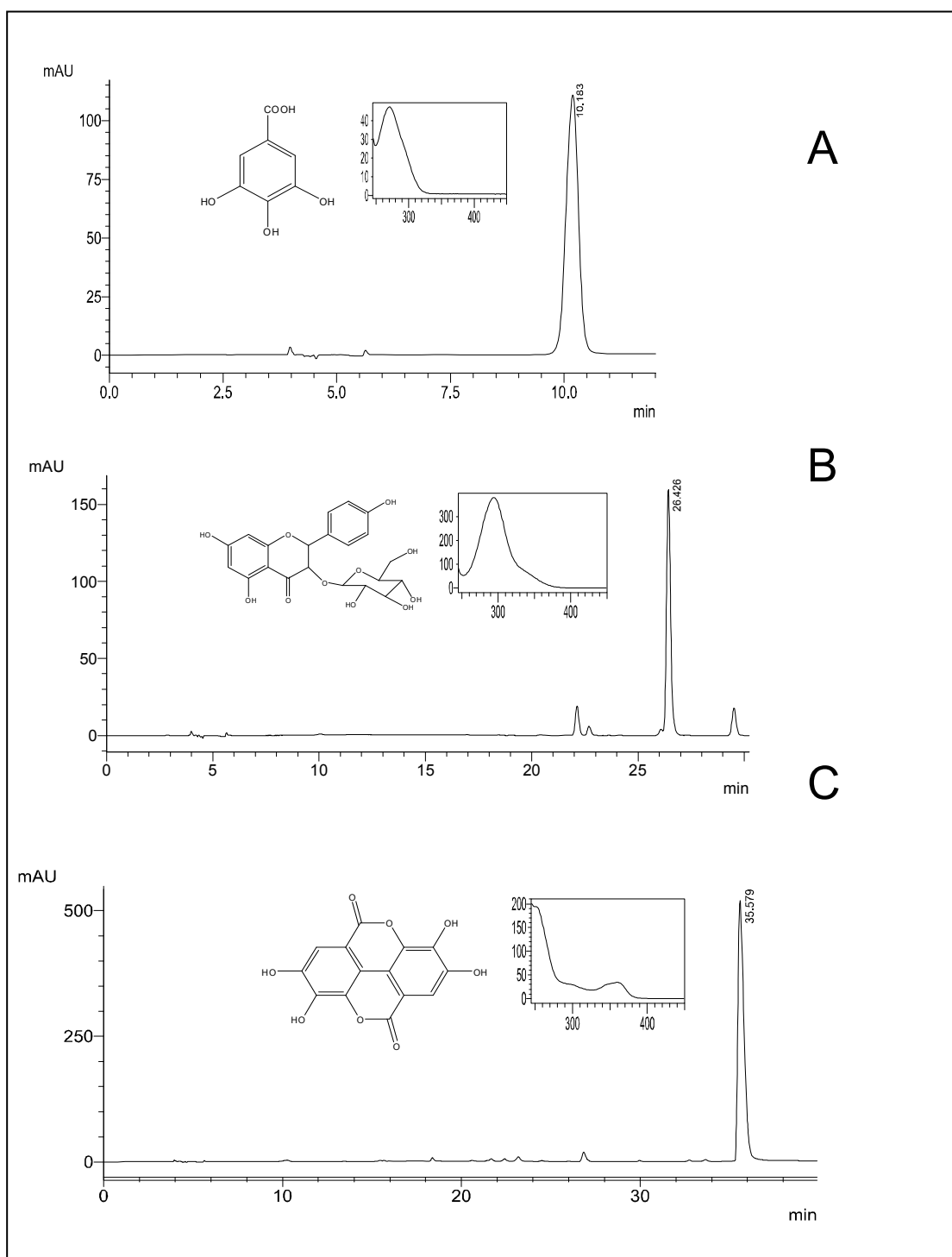


Figura 93 – Cromatogramas e espectros de absorção na região UV/Vis do ácido gálico (A), diidrokaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo (B) e ácido elágico (C), obtidos por CLAE-DAD empregando coluna C-18; eluição em gradiente com água e metanol, ambos com 1% de ácido acético (gradiente de B: 0-10% em 3 min; 10-35% de 3 a 10 min; 35-60% de 10-40 min e 60-100% de 40-43 min), fluxo 0,8 mL/ min e detecção em 294 nm.

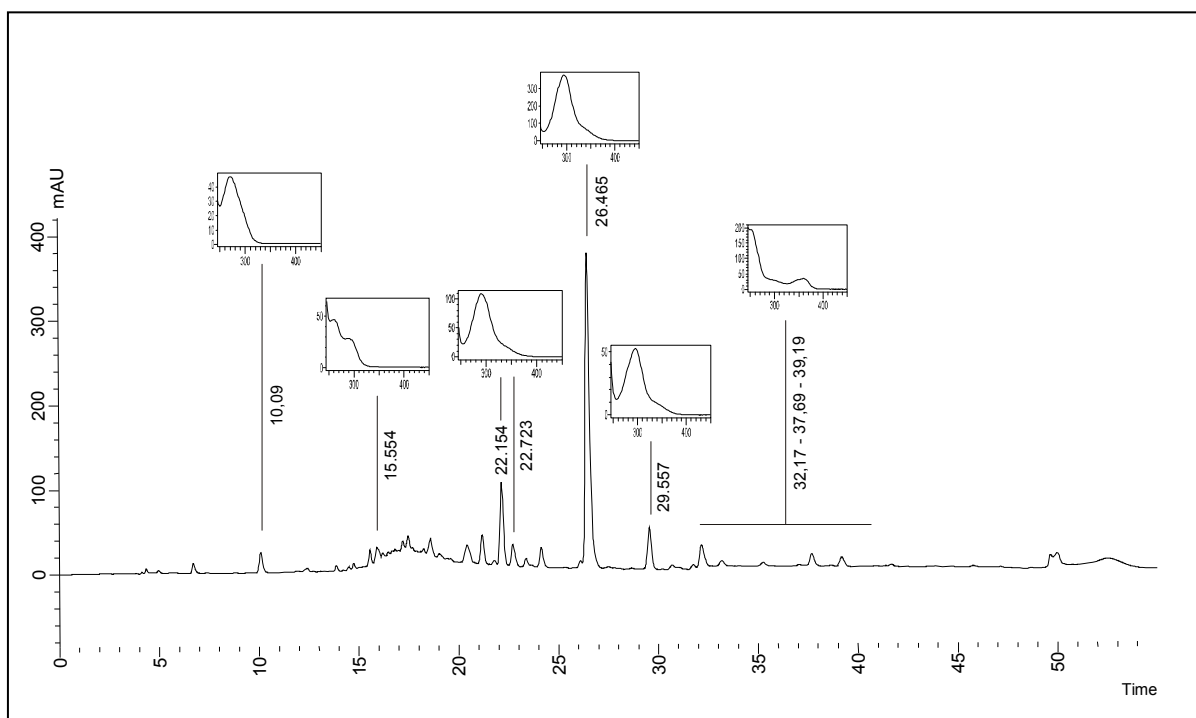


Figura 94 – Perfil cromatográfico e espectros de absorção na região do UV/Vis do infuso da raiz de *C. regium*, obtidos por CLAE-DAD empregando coluna C-18; eluição em gradiente com água e metanol, ambos com 1% de ácido acético (gradiente de B: 0-10% em 3 min; 10-35% de 3 a 10 min; 35-60% de 10-40 min e 60-100% de 40-43 min), fluxo 0,8 mL/ min e detecção em 294 nm.

A seletividade da detecção por DAD fornecendo os espectros de absorção na região do UV/Vis por toda a extensão de cada pico cromatográfico, sugere ausência de co-eluição de outras substâncias com os marcadores analisados em 294 nm (164, 165) (Figura 84).

5.3.2.4 Teor de ácido gálico e diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo

Após estabelecer um perfil cromatográfico qualitativo para raiz de *C. regium*, com garantia sobre a seletividade do método para análise de ácido gálico e do diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo, foi realizado o estudo quantitativo destes marcadores. Ambos foram quantificados com uso de padrão externo correlacionando a área do sinal da amostra com a equação de reta das curvas de calibração previamente obtidas. Este estudo foi realizado com seis diferentes

amostras coletadas bimestralmente, durante o ano de 2008, procurando verificar a sazonalidade na produção desses metabólitos.

As amostras foram extraídas de forma padronizada utilizando metanol:água (6:4) como solvente extrator, banho de ultra-som e centrifugação. A preparação seletiva (*clean up*) da solução a ser injetada no sistema por CLAE é comum para análise de amostras biológicas e produtos naturais. São recomendadas técnicas de extração em fase sólida utilizando cartuchos com sílica reversa ou partição prévia com solventes apolares e imiscíveis (148, 157, 166, 167). Tal proposta procura, prioritariamente, diminuir substâncias na matriz que possam interferir nos resultados bem como poupar o desgaste para coluna cromatográfica, entretanto, Rocha (148) informa que a purificação prévia da matriz pode acarretar a perda de analito prejudicando análises quantitativas.

Tendo em vista a boa resolução do perfil cromatográfico de *C. regium* e o uso de pré-coluna no sistema, a preparação das amostras foi baseada somente na seletividade do solvente para extração de compostos polares fenólicos e glicosilados. Neste sentido, as raízes secas (50 mg) foram extraídas com 10 mL metanol:água (6:4) sendo esta concentração determinada para não haver saturação da solução extrativa e para manter os resultados dentro da linearidade das curvas de calibração.

Considerando que o processo extrativo por maceração é otimizado pela agitação, as amostras foram submetidas ao banho de ultra-som, em temperatura ambiente e tempo padrão (10 min). Este método provoca movimentação da droga no solvente extrator através de cavitação, sendo comumente utilizado em métodos analíticos de produtos naturais (168-170). Segundo Proestos e Komaitis (169), as ondas de ultra-som intensificam a dissolução do analito por melhorar a penetração do solvente na célula vegetal ou mesmo por provocar rompimento celular propiciando extração de forma eficiente, rápida e confiável, sem haver degradação química de compostos fenólicos e antioxidantes.

As soluções foram injetadas logo após seu preparo procurando manter a repetibilidade dos experimentos diminuindo variáveis capazes de ocasionar degradações químicas do extrato polar. O grau de estabilidade das amostras foi monitorado através da comparação dos cromatogramas obtidos antes e após repouso do extrato por 72 h, em temperatura e luz ambiente. Os perfis cromatográficos mostraram que houve aumento sutil em quantidade e intensidade

de sinais nos três diferentes canais e detecção (266, 294 e 360 nm) indicando que as substâncias fenólicas presentes no extrato hidrometanólico permanecem parcialmente estáveis por 72 h, mesmo quando mantidas em condições propícias para reações de degradação (temperatura e luz ambiente) (Figura 95 e Tabela 15).

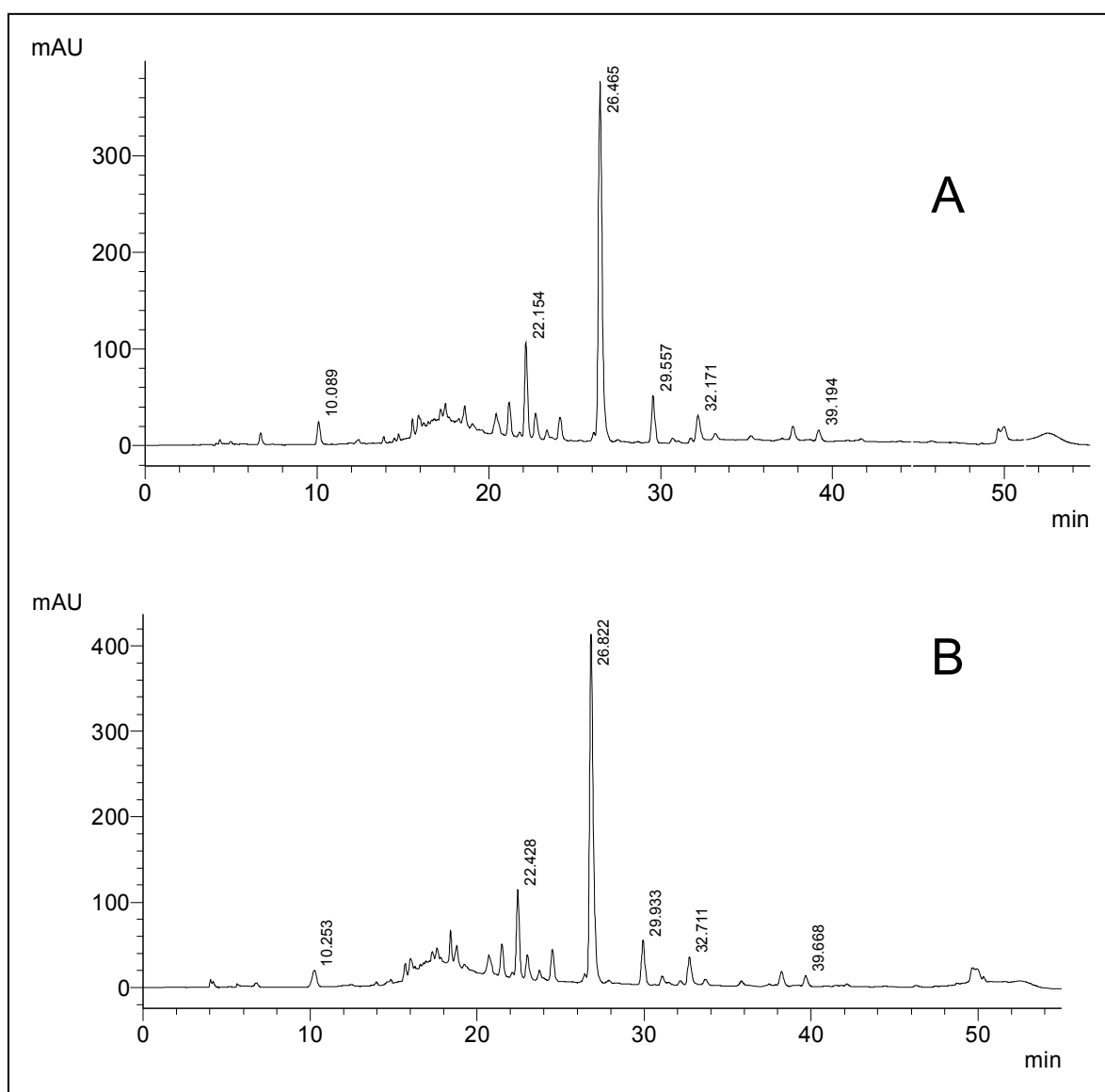


Figura 95 - Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do extrato hidrometanólico da raiz de *C. regium*, antes (A) e após repouso de 72 h (B). Sistema cromatográfico: coluna C-18; eluição em gradiente com água e metanol, ambos com 1% de ácido acético (gradiente de B: 0-10% em 3 min; 10-35% de 3 a 10 min; 35-60% de 10-40 min e 60-100% de 40-43 min), fluxo 0,8 mL/min e detecção em 294 nm.

Tabela 15 – Padrão de estabilidade do extrato hidrometanólico da raiz de *C. regium* antes e após repouso de 72 h, armazenado em luz e temperatura ambiente, através da análise dos picos obtidos por CLAE-DAD

Comprimento de onda para detecção	Tempo de repouso do extrato	Dados dos cromatogramas			
		Quantidade de picos	Area total de picos	Diferença de área	% diferença de área
266 nm	0 h	59	24689635	768283	3,0
	72 h	63	25457918		
294 nm	0 h	23	12284379	536615	4,2
	72 h	24	12820994		
360 nm	0 h	27	2749804	152372	5,5
	72 h	28	2902176		

A curva de calibração do diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo foi construída com a amostra obtida no isolamento químico (teor de pureza de 79,23% \pm 0,096) utilizando seis diferentes concentrações preparadas sequencialmente (62,5 a 500 μ g/ mL). Para aumentar a sensibilidade do método foi realizada quantificação no canal de detecção de 294 nm. A equação de regressão ($y = 39423x - 4851,4$) apresentou coeficiente de correlação linear (R) de 0,99979 e faixa de linearidade com desvio padrão relativo (DPR) de 2,56% (Figura 96). Estes parâmetros indicaram que, dentro do intervalo analisado, o método proposto forneceu resultados de área do pico cromatográfico proporcional à concentração do analito em valores aceitáveis (DPR menor do que 5%) (117).

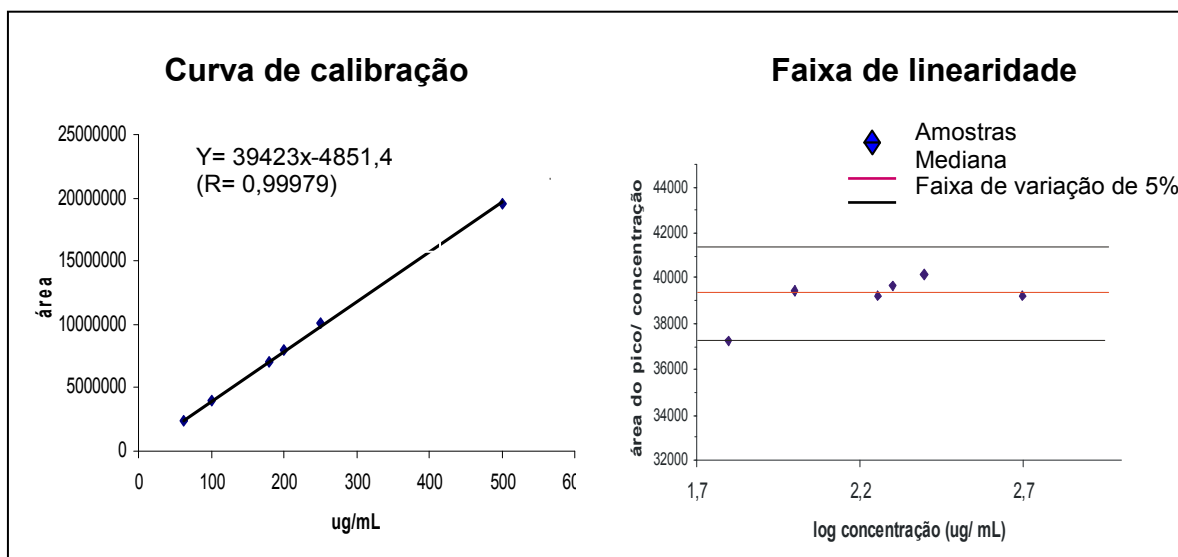


Figura 96 – Curva de calibração e faixa de linearidade do diidrokaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo, obtida pela análise por CLAE-DAD com soluções padrão nas concentrações de 62,5, 100, 180, 200, 250 e 500 µg/ mL. Sistema cromatográfico: coluna C-18; eluição em gradiente com água e metanol, ambos com 1% de ácido acético (gradiente de B: 0-10% em 3 min; 10-35% de 3 a 10 min; 35-60% de 10-40 min e 60-100% de 40-43 min), fluxo 0,8 mL/ min e detecção em 294 nm.

A curva de calibração do ácido gálico foi construída em 266 nm com amostra padrão Sigma, nas concentrações de 1,95; 3,96; 7,81; 15,62; 31,25 e 62,50 µg/ mL. Porém, a faixa de linearidade com DPR menor do que 5% somente foi obtida nas concentrações entre 1,95 a 31,25 µg/ mL (DPR= 3,62%), fornecendo a equação de regressão $Y = 60051x - 19570$, com linearidade (R) de 0,99979 (Figuras 97 e 98) (117).

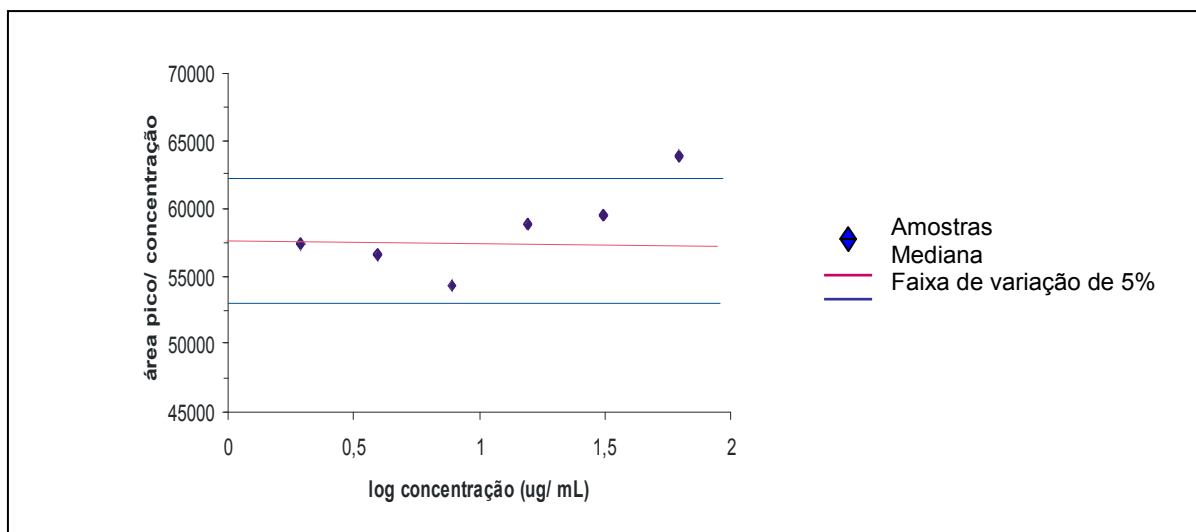


Figura 97 – Faixa de linearidade do ácido gálico obtida pela análise por CLAE-DAD com soluções padrão nas concentrações de 1,95; 3,96; 7,81; 15,62, 31,25 e 62,5 µg/ mL. Sistema cromatográfico: coluna C-18; eluição em gradiente com água e metanol, ambos com 1% de ácido acético (gradiente de B: 0-10% em 3 min; 10-35% de 3 a 10 min; 35-60% de 10-40 min e 60-100% de 40-43 min), fluxo 0,8 mL/min e detecção em 266 nm.

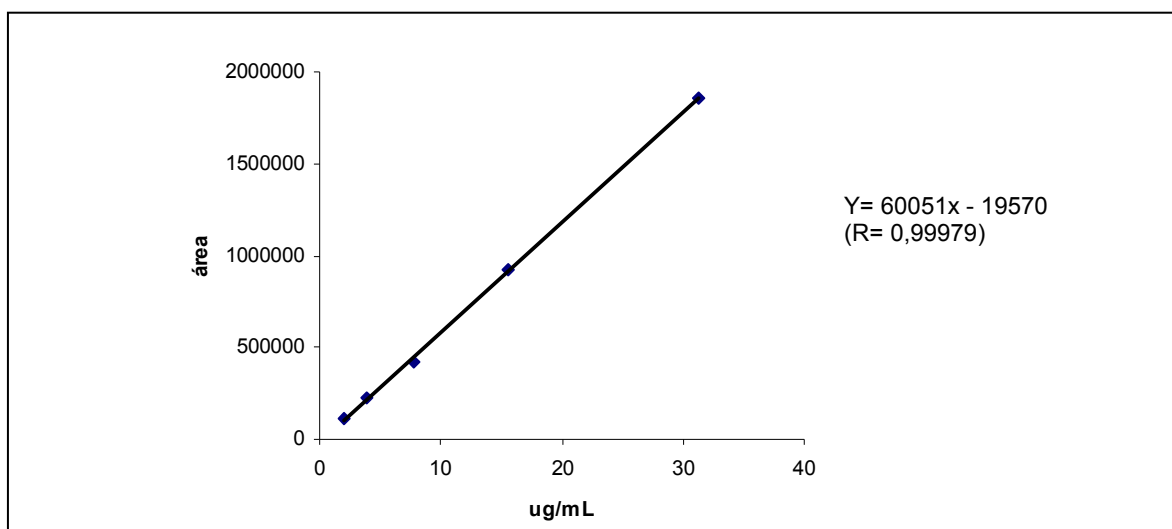


Figura 98 – Curva de calibração do ácido gálico obtida pela análise por CLAE-DAD com soluções padrão nas concentrações de 1,95; 3,96; 7,81; 15,62 e 31,25 µg/ mL. Sistema cromatográfico: coluna C-18; eluição em gradiente com água e metanol, ambos com 1% de ácido acético (gradiente de B: 0-10% em 3 min; 10-35% de 3 a 10 min; 35-60% de 10-40 min e 60-100% de 40-43 min), fluxo 0,8 mL/min e detecção em 266 nm.

As seis amostras coletadas bimestralmente forneceram perfil cromatográfico semelhante mostrando derivados do grupo galoila, flavanonas e derivados do ácido elágico, conforme informado no item 5.3.2.3 (Figuras 94 e 99). A semelhança também foi observada pelo número e área total de picos (Tabela 16).

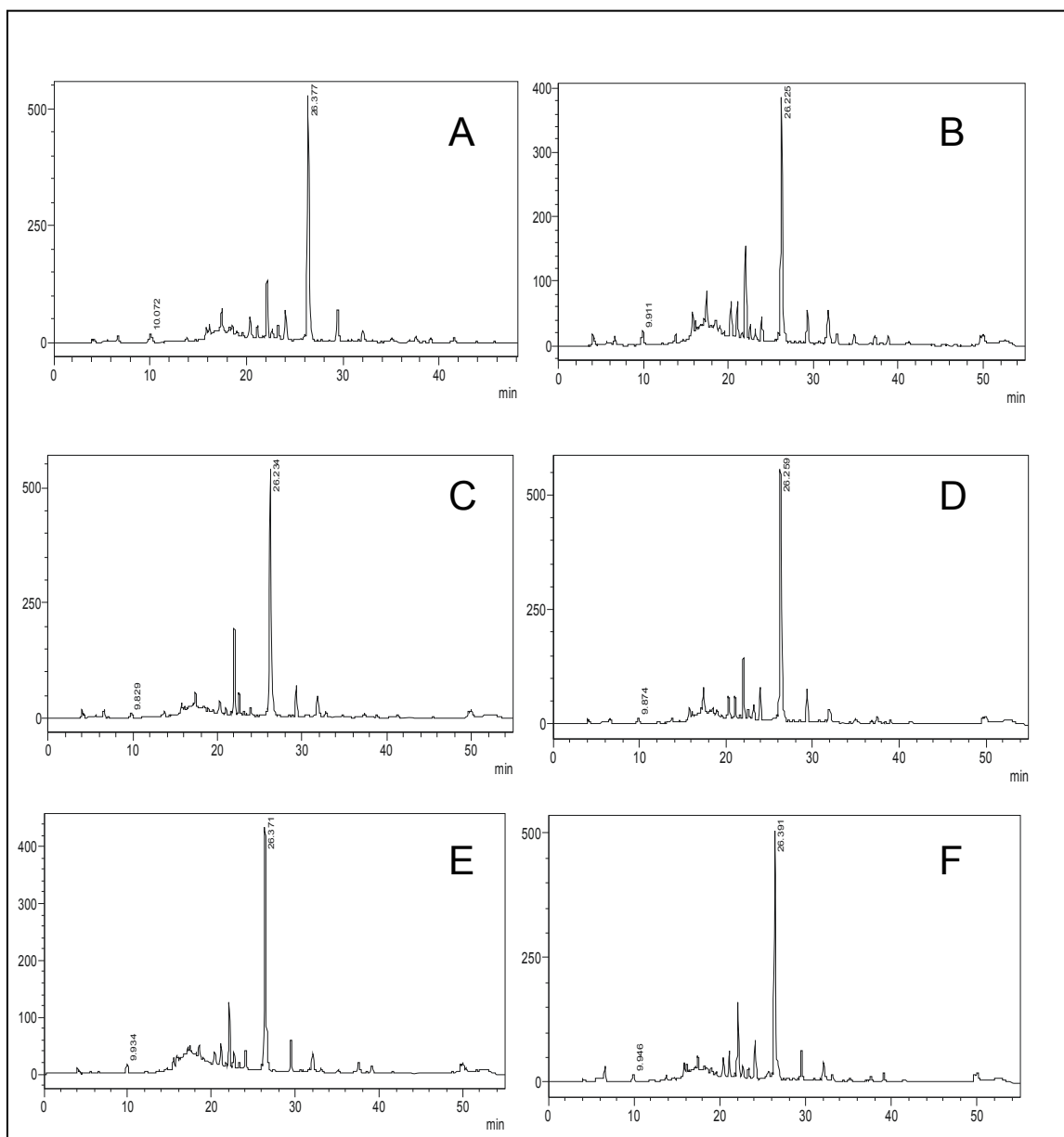


Figura 99 – Perfil cromatográfico, por CLAE-DAD, da raiz de *C. regium* coletada bimestralmente durante o ano de 2008 (fev: A; abr: B, jun: C; ago: D; out: E; dez: F), empregando coluna C-18; eluição em gradiente com água e metanol, ambos com 1% de ácido acético (gradiente de B: 0-10% em 3 min; 10-35% de 3 a 10 min; 35-60% de 10-40 min e 60-100% de 40-43 min), fluxo 0,8 mL/ min e detecção em 294 nm.

Tabela 16 – Comparação do número e área total de picos detectados por CLAE-DAD (266, 294 e 360 nm), em raízes seca de *C. regium* coletadas em fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro/ 2008

Amostra	Deteccão (nm)	nº de picos	Área total de picos	Desvio Padrão	Coef. de variação (CV%)
fev	266	59	20882852	820013	3,9
	294	23	14481426	90812	0,6
	360	23	2205638	284437	12,9
abr	266	62	24285334	253152	1,0
	294	28	15047982	569336	3,8
	360	29	3653013	138366	3,8
jun	266	59	19006212	904651	4,7
	294	23	15595119	1298700	8,3
	360	22	2897818	40698	1,4
ago	266	62	18762959	614540	3,3
	294	24	15231676	744460	4,9
	360	27	2641983	55365	2,1
out	266	59	22279771	3408062	15,3
	294	23	12260316	34030	0,3
	360	27	2779818	42445	1,5
dez	266	64	20612597	605147	2,9
	294	27	15565923	573010	3,7
	360	26	2928443	53554	1,8

Correlacionando a área do pico referente ao diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo ($T_r = 26$ min) com a curva de calibração ($y = 39423x - 4851,4$), foi verificado o valor médio das amostras de 27,87 ($\pm 4,08$) mg/ g na raiz seca, variando entre 20,96 a 32,05 mg/ g (Figuras 94 e 100, Tabelas 17 e 18). A menor concentração (20,96 mg/ g raiz seca) foi encontrada na amostra coletada em abril seguindo-se diretamente da amostra com maior concentração (32,05 mg/ g raiz seca; coleta em junho).

Tabela 17 - Área do pico do diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo, obtido por CLAE-DAD (294 nm), em raiz seca de *C. regium* coletadas em fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro/ 2008

Amostra	Área média	Desvio Padrão	Coef. de variação (CV%)
fev	7288378	28947	0,40
abr	5210456	299056	5,56
jun	7969344	128354	1,61
ago	7591008	342550	4,51
out	6263507	32700	0,52
dez	7247232	95646	1,32

Tabela 18 – Concentração do diidrokaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo (mg/ g) em raiz seca de *C. regium* coletadas em fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro/ 2008

Amostra	Teor médio (µg/mL)	Teor médio (mg/g)*	Desvio padrão (DP)**	Coef. de variação (CV%)**
fev	185,00	29,31	0,116	0,396
abr	132,29	20,96	0,422	2,013
jun	202,27	32,05	0,516	1,610
ago	192,67	30,53	1,377	4,510
out	159,00	25,19	0,131	0,520
dez	183,95	29,15	0,384	1,317
Média	--	27,87	4,078	14,63

*valor obtido considerando a pureza do padrão (79,23%).

**valores obtidos a partir das repetições em mg/g.

A determinação quantitativa do ácido gálico nas amostras bimestrais foi realizada a partir da correlação entre a área do pico ($T_r = 10$ min) com a equação de regressão $y = 60051x - 19570$ (Figura 98). Desta forma, o teor de ácido gálico foi determinado pelo valor médio de 1,82 ($\pm 0,475$) mg/ g na raiz seca, variando entre 1,13 a 2,40 mg/ g, com menor concentração em junho (1,13 mg/ g raiz seca) e maior em abril (2,40 mg/ g raiz seca) (Tabelas 19 e 20, Figura 100).

Tabela 19– Área do pico do ácido gálico, obtido por CLAE-DAD (266 nm), em raiz seca de *C. regium* coletadas em fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro/ 2008

Amostra	Área média	Desvio Padrão	Coef. de variação (CV%)
fev	659358	3353	0,51
abr	701144	8112	1,16
jun	320986	8747	2,72
ago	425549	6863	1,61
out	553873	2591	0,47
dez	514085	1769	0,34

Tabela 20- Concentração de ácido gálico (mg/ g) em raiz seca de *C. regium* coletadas em fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro/ 2008

Amostra	Teor médio (µg/mL)	Teor médio (mg/g)	Desvio padrão (DP)*	Coef. de variação (CV%)*
fev	11,28	2,26	0,011	0,5
abr	12,00	2,40	0,028	1,17
jun	5,67	1,13	0,028	2,50
ago	7,41	1,48	0,028	1,91
out	9,54	1,90	0,007	0,37
dez	8,88	1,77	0,007	0,40
Média	--	1,82	0,475	26,09

**valores obtidos a partir das repetições em mg/g.

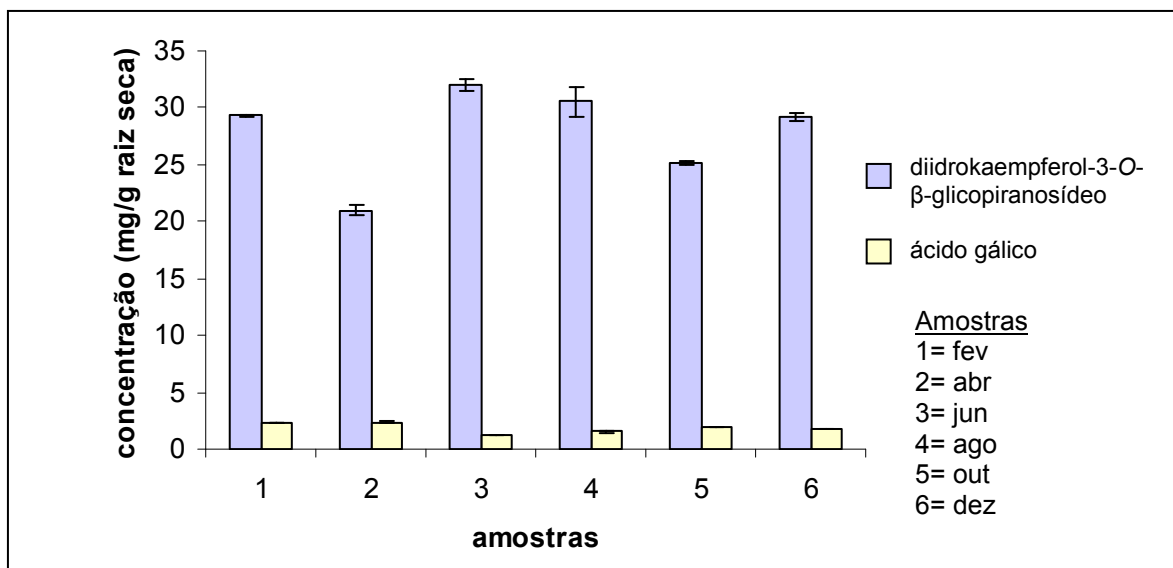


Figura 100 – Concentração (mg/ g) do diidrokaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo e do ácido gálico nas raízes secas de *C. regium* coletadas em fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro/ 2008.

O teor da flavanona (2,79 %, 27,9 mg/ g raiz seca) mostra-se alto quando em comparação com os marcadores químicos usuais de outras espécies vegetais. Por ser uma substância com distribuição restrita e baixo rendimento no reino vegetal, sua quantificação não é reportada na literatura. Trabalhos como os de Baderschneider e Winterhalter (139) e de Iwashina *et al.* (144) abordam somente o experimento analítico não fazendo referência a quantificação.

Já o teor médio de ácido gálico em *C. regium* (0,18%, 1,82 mg/ g raiz seca) assemelha-se com o valor farmacopêico para *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra) que deve possuir, no mínimo, 0,15 % nas folhas e ramos secos. A concentração desse metabólito também é usualmente caracterizada em frutas *in natura* ou em bebidas (137, 168, 171).

A distribuição destes marcadores entre as amostras analisadas não apresentou grande variação, havendo desvio padrão relativo de 14,6% para a flavanona e 26,1 % para o ácido gálico. Este fato, somado com a semelhança dos perfis cromatográficos entre das amostras, sugere que a sazonalidade e a ontogenicidade não influenciam demasiadamente a produção dos metabólitos analisados bem como dos outros compostos fenólicos polares detectados no cromatograma.

Mesmo havendo diferenças significativas entre o teor médio da flavanona (27,87 %) e o teor de ácido gálico (1,83 %), nota-se que a distribuição destes marcadores em *C. regium* são antagônicas, ou seja, a concentração de flavanona é inversamente proporcional à concentração de ácido gálico. Fato semelhante foi discutido por Vieira (172) e Coutinho (165) ao compararem, respectivamente, os teores de flavonóides e fenilpropanos em *Ocimum gratissimum* e *Campomanesia adamantium*. Estes autores reportam que este fato pode ser ocasionado pela competição desses metabólitos pelo precursor químico fenilalanina.

Apesar da biossíntese do ácido gálico não envolver o aminoácido fenilalanina, este é produzido diretamente do ácido chiquímico, precursor básico dos compostos fenólicos. Já a rota biossintética dos flavonóides ocorre pelo cruzamento das vias de formação dos policetídeos com o ácido chiquímico através da reação de Claisen que possibilita a união de uma unidade de ácido cumárico com três unidades de acetil-CoA (Figura 101) (119, 173). Sendo assim, é provável que possa estar ocorrendo competição biossintética para formação de ácido gálico e diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo em *C. regium*, conforme informam Vieira (172) e Coutinho (165) para as outras duas espécies.

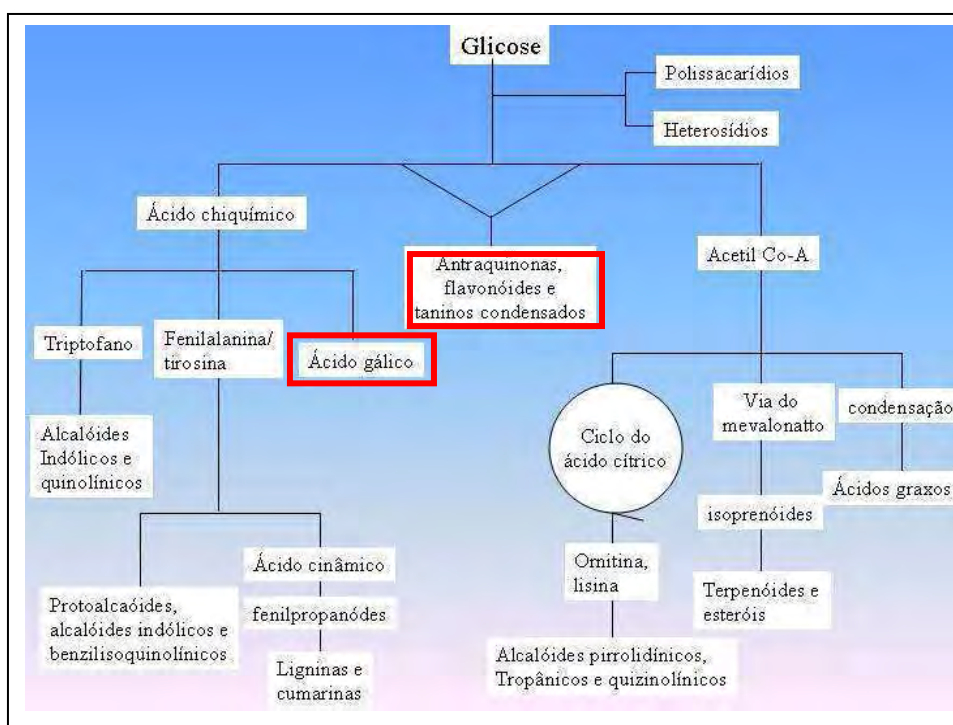


Figura 101 – Biossíntese de metabólitos secundários a partir da glicose enfatizando a formação de ácido gálico e flavonóides. Fonte: Santos (173).

5.3.2.5 Considerações sobre a análise de autenticidade e integridade química da raiz de *C. regium*

No que se refere aos métodos analíticos úteis para verificar a autenticidade e integridade química da raiz de *C. regium*, a utilização dos ácidos elágico (**1**) e gálico (**3**) e o diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo (**5**) mostrou ser vantajosa pelos experimentos por CCD e CLAE-DAD descritos neste trabalho.

Os ácidos gálico e elágico são substâncias ativas reportadas como marcadores em diferentes espécies vegetais havendo, inclusive, especificação farmacopêica para análises quali e quantitativas do ácido gálico em *Phyllanthus niruri* e a padronização da sua concentração em diferentes frutas e vinhos (136, 174-176). Porém, são substâncias de distribuição ampla não possuindo o requisito de especificidade útil para um marcador, além de serem produtos de degradação dos taninos hidrolisáveis cujas quantificações estariam mais relacionadas com ensaios de integridade química (146-149).

Neste sentido, entre as substâncias fenólicas aqui analisadas, o diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo mostra-se mais adequado como substância marcadora do extrato polar da raiz de *C. regium*. A especificidade e a facilidade analítica do método proposto pelo ensaio por CLAE-DAD, somado com o alto teor (27,9 mg/ g), importância biológica (127) e ocorrência restrita (134), são fatores que validam a utilização do diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo como marcador químico viável para determinação da autenticidade e integridade da droga vegetal comercializada da raiz de *C. regium* (146-149).

A metodologia analítica proposta por este trabalho também pode direcionar o monitoramento de outros órgãos de *C. regium* visando verificar o padrão químico de partes renováveis desta espécie. Este conhecimento pode auxiliar na preservação desta espécie visto haver coleta extrativista e não controlada da sua raiz para uso medicinal o que, provavelmente, é o motivo maior de inclusão de *C. regium* na lista de espécies brasileiras ameaçadas de extinção (33).

6 CONCLUSÃO

A investigação fitoquímica do extrato hidroalcoólico forneceu cinco derivados fenólicos [ácido elágico, ácido gálico, diidrokaempferol, diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo e diidrokaempferol-3-O- β -(6''-galoil)-glicopiranosídeo] e dois triacilbenzenos conhecidos como cochlosperminas A e B. Com exceção do diidrokaempferol e seu glicosídeo, é a primeira vez que estas substâncias são reportadas nesta espécie e o registro do diidrokaempferol-3-O- β -(6''-galoil)-glicopiranosídeo é inédito na literatura. Tal resultado fornece informações sobre o padrão quimiotaxonômico do gênero que pode ser caracterizado pela presença de flavonóides, triacilbenzenos e derivados do ácido gálico.

O extrato hidroalcoólico e suas frações, particularmente a fração acetato de etila, apresentaram capacidade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e ausência de atividade sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae*. A presença dos ácidos fenólicos pode ratificar a ação antimicrobiana observada no extrato hidroalcoólico e frações mais polares da raiz de *C. regium*, além de fornecer informações química que estão de acordo com o uso tradicional da raiz para o tratamento de infecções.

Com relação aos ensaios farmacognósticos, a análise botânica descreve a presença de raiz em crescimento secundário com região cortical menos abundante possuindo bolsa com conteúdo oleoso, drusas, grãos de amido e idioblastos com mucilagens. O floema possui formato ogival com fibras alternadas e o xilema possui prevalência de vasos isolados. O raio do xilema secundário é caracterizado por conteúdo fenólico. Presença abundante de grãos de amido com formato arredondado e hilo central existe por toda a extensão da raiz.

O pó da droga forneceu média granulométrica de 0,285 mm, densidade aparente de 0,40 g/mL, densidade por compactação de 0,62 g/mL, teores de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido de 8,2, 3,1 e 0,08%, respectivamente. O *fingerprint* foi determinado por CCD e CLAE-DAD empregando o ácido elágico, ácido gálico e o diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo como marcadores. A quantificação destas duas últimas substâncias indicou teor médio de 1,8 e 27,9 mg/g, respectivamente, sem haver variação sazonal entre as amostras coletadas bimestralmente durante o ano de 2008.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bonati A. How and why should we standardize phytopharmaceutical drugs for clinical validation? *J. ethnopharmacol.* 1991; 32, 195-7.
2. Ferreira SH, Barata LES, Salles, SLM, Queiroz SRR, Heluy-Neto NE, Corazza R, Farias RC. Medicamentos a partir de plantas medicinais do Brasil. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998. 132p.
- 3 Sharaphin N. Matérias-primas para indústria de fitofármacos. In: Sharaphin N. [org.] Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos. Santafé de Bogotá: CYTED, 2000.
4. Zaupa C, Carraschini L, Tsuzuki JK, Boeira R, Dutra AL, Akimoto L, Kaneshima EM, Silva, JC, Marques LC. Estudo toxicológico pré-clínico (agudo e sub-agudo) do produto Propovit Plus[®] em roedores. *Acta farm bonaer.* 2002; 21(4), 265-72.
5. Marques LC. Panorama sobre a política nacional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. *Fármacos & Medicamentos.* 2002; 4(20), 22-30.
6. Schulz V, Hansel R, Tyler VE. *Fitoterapia Racional.* 1 ed. Barueri: Manole, 2002.
7. BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 06 de 31 de janeiro de 1995. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União.* Brasília, 31 de jan., 1994.
8. _____ Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 17 de 24 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União.* Brasília, 25 fev., 2000.
9. _____ Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União.* Brasília, 18 mar., 2004a.

10. Petrovick PR, Marques LC, De Paula IC. New rules phytopharmaceutical drug registration in Brasil. *J Ethnopharmacol.* 1999; 66, 51-5.
11. Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Godinho RO, Lima TCM. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. [org.] *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* Porto Alegre: UFRGS, 1999.
12. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 971 de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. *Diário Oficial da União.* Brasília, 03 mai, 2006.
13. List PH, Schmidt PC. *Phytopharmaceutical technology.* CRC Press: Boca Raton, 1989.
14. Hostettman K., Queiroz EF, Vieira PC. *Princípios ativos de plantas superiores.* São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2003.
15. Wagner H. Pesquisa fitomédica no novo milênio: tendências e mudanças. In: Yunes RA, Cechinel-Filho V. [org.] *Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia.* Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2007.
- 16 Farias MR. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gusmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR [org.]. *Farmacognosia da planta ao medicamento.* Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.
17. Reis MS, Mariot A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gusmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR [org.]. *Farmacognosia da planta ao medicamento.* Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.
18. Schenkel EL, Gosmann G, Petrovick PR. Produtos de origem vegetal e desenvolvimento de medicamentos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gusmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR [org.]. *Farmacognosia da planta ao*

medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

19. Nunes GP, Silva MF, Resende UM, Siqueira JM. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, MS. Rev bras farmacogn. 2003; 13(2), 83-92.

20. Morais IC, Silva LDG, Ferreira HD, Paula JR, Tresvenzol LMF. Levantamento sobre plantas medicinais comercializadas em Goiânia: abordagem popular (raizeiros) e abordagem científica (levantamento bibliográfico). Rev eletr farm. v. 2005; 2(2), 13-6.

21. Barroso GM. Sistemática de angiospermas no Brasil. Viçosa, SP: UFV, 1991.

22. Souza VC, Lorenzi H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil baseado em APG II. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

23. Ritto JLA. Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluído de algodãozinho-do-campo *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr.) Pilger. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo;1996.

24. Pio-Correa M. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. v.13, p. 513-14, 1975.

25. Kirizawa M. Contribuição ao conhecimento morfo-ecológico e do desenvolvimento anatômico dos órgãos vegetativos e de reprodução de *Cochlospermum regium* (Mart. et Sch.) Pilger - *Cochlospermaceae*. [tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1981.

26. Joly AB. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 13 ed. São Paulo: Ed. Nacional, 2002.

27. Ferri MG, Menezes NL, Monteiro WR. Glossário ilustrado de botânica. São Paulo: Ed. Nobel, 1981.

28. Alzugaray D, Alzugaray C. Dicionário de termos botânicos. São Paulo: Ed. Três, 1988.
29. Warning E, Ferri NG. Lagoa Santa: a vegetação de cerrados brasileiros. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1973.
30. Silberbauer-Gottsberger I. O cerrado como potencial de plantas medicinais e tóxicas. *Oréades*. 1981/82; 8(14-15), 15-30.
31. Pott A, Pott VJ. Plantas do pantanal. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa agropecuária do pantanal. Corumbá: EMBRAPA, 1994.
32. Borges HBN, Sherpherd GJ. Flores e estrutura do estrato lenhoso numa comunidade de Cerrado em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. *Rev bras bot*. 2005; 28(1), 61-74.
33. IBAMA. Espécies utilizadas como medicinais relacionadas em listas oficiais de espécies da flora ameaçada do Brasil. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/flora/divs/plantasextinção.pdf>. Acesso em 12/01/2008.
34. Sales DM. Germinação de sementes de [*Cochlospermum regium* (Mart. E Schr.) Pilg.] *Cochlospermaceae*. [dissertação de mestrado]. Cuiabá: Faculdade de Agronomia e Medicina veterinária da UFMT, Universidade Federal de Mato Grosso; 2001.
35. Molinari ACF, Coelho MFB, Albuquerque MCF. Germinação de sementes da planta medicinal algodão-do-campo [*Cochlospermum regium* (Mart. et Schl.) Pilger] – *Cochlospermaceae*. *Rev agric trop*. 1996; 2(1), 25-31.
36. Nogueira AC, Kuniyoshi YS. *Cochlospermum regium* (Mart. & Schum.) Pilger – germinação e reintrodução no Estado do Paraná; XLIV Congresso Nacional de Botânica; Salvador, 1998.

37. Mello CMC, Reis DL, Correia H. Comportamento fisiológico de sementes de *Cochlospermum regium* (Mart.) Pilger; XLIX Congresso Nacional de Botânica; Salvador, 1998.
38. Albuquerque MCF, Coelho MFB, Albrecht JMF. Germinação de sementes de espécies medicinais do cerrado; I Seminário Matogrossense de etnobiologia e etnoecologia e II Seminário Centro-Oeste de Plantas Medicinais. [periódico na internet]. 12/01/2002. Artigos. Disponível em; <http://www.ufmt.br/etnoplan/artigos>. Acesso em 12/01/2008.
39. MISSOURI BOTANICAL GARDEN. Disponível em: [http// www.tropicos.org/NameSynonyms.aspx?nameid=8000024](http://www.tropicos.org/NameSynonyms.aspx?nameid=8000024). Acesso em 11/04/2008.
40. Guarim-Neto G, Morais RG. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta bot bras*. 2003; 17(4), 561-84.
41. Ritto JLA, Kato ETM. Estudo morfo-histológico de raízes de algodãozinho-do-campo – *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger. *Lecta-USF*. 1998; 16(2), 97-109.
42. Rouquayrol MZ, Fonteles MC, Alencar JE, Abreu-Matos FJ, Craveiro AA. Atividade moluscicida de óleos essenciais de plantas do nordeste brasileiro. *Rev bras pesq med biol*. 1980; 13(4-6), 135-43.
43. De La Cruz MGF. Plantas medicinais utilizadas por raizeiros: uma abordagem etnobotânica no contexto saúde e doença- Cuiabá, MT. [dissertação de mestrado] Cuiabá: Mestrado em Saúde e Ambiente, Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso; 1997.
44. Somavilla NS. Utilização de plantas medicinais por uma comunidade garimperia do sudoeste matogrossense, Alto Coité-Poxoréo/ Mato Grosso. [dissertação de mestrado] Cuiabá: Mestrado em Saúde e Ambiente, Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso; 1998.

45. Loureiro RNO. Vida comunitária e o uso de plantas medicinais em Baixio, Barra dos Bugres, Mato Grosso. [dissertação de mestrado] Cuiabá: Mestrado em Saúde e Ambiente, Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso; 1999.
46. Vila-Verde GM, Paula JR, Caneiro DM. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). Rev bras farmacogn. 2003; 13(supl.), 64-6.
47. Guarim-Neto G. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. Revista eletrônica do mestrado em educação ambiental. 2006; 17(jul-dez), 71-89.
48. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 1.674 de 16 de outubro de 2001. Indefere o registro de Medicamento Novo, Medicamento Fitoterápico Novo, Medicamento Fitoterápico Similar, Renovação de Registro de Medicamento Similar, de produtos farmacêuticos, conforme relação em anexo. Diário Oficial da União. Brasília, 16 out., 2001.
49. _____ Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 1.175 de 08 de julho de 2002. Determina, como medida de interesse sanitário, a apreensão, em todo território nacional, dos medicamentos EXTRATO COMPOSTO MAGARAZ, DIABESAN MAGARAZ, XAROPE MAGARAZ e ELIXIR SENA MAGARAZ, da empresa Indústria e Comércio de Produtos Naturais Magaras Ltda – Me. Diário Oficial da União. Brasília, 08 jul., 2002.
50. LABORATOIRE PLANTES ET MEDICINES. Disponível em: <http://www.automedication.fr/medicament/medicament-gp2507-POCONEOL%2BN%2B16.html>. Acesso em 11/04/2008.
51. Fontes OL. Farmácia homeopática: teoria e prática. São Paulo: Manole, 2001.
52. Hahnemann CFS. Organon de la medicina. 6 ed. Santiago: Hochstetter, 1980

53. Siqueira JM, Silva RF, Resende UM, Castro MSA. Plantas comercializadas pelos raizeiros de Campo Grande/MS; XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 1994.
54. Oliveira CC, Siqueira JM, Souza KCB, Resende UM. Antibacterial activity of rhizomes from *Cochlospermum regium*: preliminary results. *Fitoterapia*. 1996; 67(2), 176.
55. Moraes MO, Fonteles MC, Moraes MEA. Screening for anticancer activity of plants from the Northeast of Brazil. *Fitoterapia*. 1997; LXVIII(3), 235-9.
56. Ritto JLA, Oliveira F, Carvalho JE, Dias PC. Avaliação farmacológica do extrato fluído de *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr.) Pilger. *Lecta*. 1996; 14(2), 27-36.
57. OGA S. Fundamentos de toxicologia. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 1996.
58. Toledo MI. Estudo de toxicidade aguda e sub-crônica em extratos hidroetanólicos de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1996.
59. Toledo MI, Siqueira JM, Araujo LCL, Oga S. Acute and subacute toxicity of *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilger. *Phytother res*. 2000; 14, 359-361.
60. Nunes WB. Avaliação do potencial mutagênico e/ou recombinogênico do algodãozinho-do-campo – *Cochlospermum regium* (Mart et Schrank) Pilger, em células somáticas e germinativas de *Drosophila melanogaster*. [dissertação de mestrado]. Goiás: Universidade Federal de Goiás, 2000.
61. Nunes WB, Carvalho S. Evaluation of the mutagenic potencial of *Cochlospermum regium* in *Drosophila melanogaster* male germ cells. *Genet mol biol*. 2003; 26(4), 545-9.

62. Ceschini L, Campos EG. Cytotoxic effects of *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger aqueous root extract on mammalian cells. J Ethnopharmacol. 2006; 103, 302-5.
63. Castro DB, Santos DB, Ferreira HD, Santos SC, Chen-Chen L. Atividades mutagênica e citotóxica do extrato de *Cochlospermum regium* Mart. (algodãozinho-do-campo) em camundongos. Rev bras plantas med. 2004; 6(3), 15-9.
64. Cabral F. Avaliação do efeito genotóxico do extrato vegetal de *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilger em camundongos. [monografia de conclusão de curso]. Campo Grande/ MS: Curso de Farmácia, Universidade Anhanguera-Uniderp; 2007.
65. Andrade LS, Santos DB, Castro DB, Guillo LA, Chen LC. Absence of antimutagenicity of *Cochlospermum regium* (Mart and Schr.) Pilger 1924 by micronucleus test in mice. Braz J biol. 2008; 68: 163-7.
66. Siqueira JM, Castro MAS, Mello JCP, Kassab NM, Vieira ICP, Amorin LWK, Guerra MC, Rezende UM. Flavanona do extrato hidroetanólico de *Cochlospermum regium* (Mart. & Sch.) Pilger (algodãozinho); XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 1994.
67. De Lima DP, Castro MAS, Mello JCP, De Siqueira JM, Kassab NM. A flavanone glycoside from *Cochlospermum regium*. Fitoterapia. 1995; 66(6): 545-6.
68. Castro MAS, De Siqueira JM, Paz-Vieira IC, Kassab NM. Estudos sobre os efeito analgésico e anti-edematogênico de uma flavanona isolada de *Cochlospermum regium*, “algodãozinho”; XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 1994.
69. Castro MSA. Mecanismo envolvidos no efeito antinoceptiva do 3-O-glicosil-dihidrocanferol, flavonóide extraído dos rizomas de *Cochlospermum regium* (algodãozinho). [tese de doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2000.

70. Brum RL, Honda NK, Hess SC, Cruz AB, Moretto E. Antibacterial activity of *Cochlospermum regium* essential oil. *Fitoterapia*. 1997; LXVIII(1), 79.
71. Fratin LLC, Yoshida NC, Solon S, Siqueira JM. Estudo fitoquímico biomonitorado de *Cochlospermum regium* (algodãozinho); IV Encontro de Pesquisa e Iniciação científica da UNIDERP; Campo Grande/ MS: Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal; 2005.
72. FARMACOPÉIA DOS Estados Unidos do Brasil. 2 ed, São Paulo: Gráfica Siqueira, 1959.
73. Oliveira A, Santana JC, Gil ES. Estudo eletroanalítico na análise de diferentes amostras de algodãozinho (*Cochlospermum regium*). *Rev eletr farm*. 2007; 4(2), 84-6.
74. Diallo B, Vanhaelen M. Apocarotenoids from *Cochlospermum tinctorium*. *Phytochemistry*, 1987; 26(5), 1491-2.
75. Diallo B, Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastre R, Konoshima T, Kozuka M, Tozuda H. Studies on skin-tumor promotion. Inhibitory effects of triterpenes from *Cochlospermum tinctorium* on Epstein-Barr virus activation. *J nat prod*. 1989; 52(4), 879-81.
76. Diallo B, Vanhaelen-Fastre R, Vanhaelen M, Fiegel C, Joyeux M, Roland A, Fleurentin J. Further studies on the hepatoprotective effects of *Cochlospermum tinctorium* rhizomes. *J ethnopharmacol*. 1992; 36, 137-42.
77. Diallo B, Vanhaelen-Fastre R, Vanhaelen M. Triacylbenzenes and long-chain volatile ketones from *Cochlospermum tinctorium* rhizome. *Phytochemistry*, 1991; 30(12), 4153-6.
78. Ballin NZ, Traore M, Tinto H, Sittie A, Molgaard P, Olsen CE, Kharazmi A Christensen SB. Antiplasmodial compounds from *Cochlospermum tinctorium*. *J nat Prod*. 2002; 65, 1325-27.

79. Nergard CS, Kiyohara H, Reynolds JC, Thomas-Oastes JE, Matsumoto T, Yamada H, Patel T, Petersen D, Michaelsen TE, Diallo D, Paulsen BS. Structures and structures-activity relationships of three mitogenic and complement fixing pectic arabinogalactans from the Malian antiulcer plants *Cochlospermum tinctorium* A. Rich and *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. Ex Walp. *Biomacromol.* 2006; 7, 71-9.
80. Nerdgard CS, Diallo D, Inngjerdingen K, Michaelsen TE, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H, Paulsen BS. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali anti-ulcer, radical scavenging and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. *J ethnopharmacol.* 2005; 96, 255-69.
81. Ram VJ. Herbal preparations as a source of hepatoprotective agents. *Drugs News & Perspectives.* 2001; 14(6), 353-63.
82. Dalvi RR, Sere A. Protective effect of *Cochlospermum tinctorium* A Rich. Extract versus aflatoxin B – induced liver damage in rats. *Int J crude drug res.* 1988; 26(2), 117-20.
83. Benoit F, Valentine A, Pélissier Y, Marion C, Dakuyo Z, Malié M, Bastide JM. Antimalaria activity in vitro of *Cochlospermum tinctorium* tubercle extracts. *Trans R soc trop med hyg.* 1995; 89, 217-8.
84. Benoit-Vical F, Valentine A, Malié M, Bastide JM, Bessiére JM. *In vitro* antimalaria activity and cytotoxicity of *Cochlospermum tinctorium* and *Cochlospermum planchonii* leaf extracts and essential oils. *Planta med.* 1999; 65, 378-81.
85. Benoit-Vical F, Valentine A, Mallié M, Bessiére JM. *In vitro* Antiplasmodial activity of *Cochlospermum tinctorium* and *Cochlospermum planchonii* tubercle essential oils. *J. essential oil res.* 2001; 13, 65-7.
86. Silva O, Duarte A, Cabrita J, Pimentel M, Diniz A, Gomes E. Antimicrobial activity of Guinea-Bissau traditional remedies. *J ethnopharmacol.* 1996; 50, 55-9.

87. Diallo B, Vanhaelen M, Kiso Y, Hikino I. Antihepatotoxic actions of *Cochlospermum tinctorium* rhizomes. *J ethnopharmacol.* 1987; 20, 239-43.
88. Esposito-Avella M, Brown P, Tejeira I, Buitrago R, Barrios L, Sanchez C, Gupta MP, Cedeno J. Pharmacological screening of Panamanian medicinal plants. *Int J crude drug res.* 1985; 23(1), 17-25.
89. Achenbach H, Blumm E, Waibel R. Vitixanthin and dihydrovitixanthin new unusual 7'-apocarotenoic acids from *C. vitifolium*. *Tetrah lett.* 1989; 30(23) 3059-60.
90. Caballero-George C, Vanderheyden PML, Solis PN, Pieters L, Shahat AA, Gupta MP, Vauquelin G, Vlietinck AJ. Biological screening of selected medicinal Panamanian plants by radioligand-binding techniques. *Phytomedicine.* 2001; 81, 59-70.
91. Deharo E, Baelmans R, Gimenez A, Quenevo C, Bourdy G. *In vitro* immunomodulatory activity of plants used by the Tacana ethnic group in Bolivia. *Phytomedicine.* 2004; 1, 516-522.
92. Almeida SCX, Lemos TLG, Silveira ER, Pessoa ODL. Constituintes químicos voláteis e não voláteis de *Cochlospermum vitifolium* (Willdenow) Sprengel. *Quim nova.* 2005; 28(1), 57-60.
93. Sanches-Salgado JC, Ortiz-Andrade RR, Aguirre-Crespo F, Vergara-Galicia J, Leon-Rivera I, Montes S, Villalobos-Molina R, Estrada-Soto S. Hypoglycemic vasorelaxant and hepatoprotective effects of *Cochlospermum vitifolium* (Willd.) Sprengel: a potencial agent for the treatment of metabolic syndrome. *J ethnopharmacol.* 2007; 109, 400-5.
94. Aliyu R, Okoye ZSC, Thomas-Shier W. The hepatoprotective cytochrome P-450 enzyme inhibitor isolated from the Nigerian medicinal plant *Cochlospermum planchonii* is a zinc salt. *J ethnopharmacol.* 1995; 48, 89-97.

95. Benoit-Vical F, Valentin A, Da B, Dakuyo Z, Descamps L, Mallié M. N'Dribala (*Cochlospermum planchonii*) versus chloroquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. J ethnopharmacol. 2003; 89, 111-4.
96. Anthony JP, Fyfe L, Smith H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? Trends parasitol. 2005; 21(10), 462-8.
97. Vonthron-Sénecheau C, Weniger B, Ouattara M, Tra-Bi F, Kamenan A, Lobstein A, Brun R, Anton R. *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected Ivorian plants. J ethnopharmacol. 2003; 87, 221-5.
98. Atawodi S. E. Comparative in vitro trypanocidal activities of petroleum ether, chloroform, methanol and aqueous extracts of some Nigerian savannah plants. African J biotechnol. 2005; 4(2), 177-82.
99. Presber W, Hegenscheid B, Friedmann-Alvermann B, Dörge S, Voigt G, Hiller K, Hils J, May A, Böthig B. Antiviral activity of extracts of *Cochlospermum angolense* Welw. Pharmazie. 1987; 42(10), 707-8.
100. Presber W, Herrmann DK, Hegenscheid B. The effect of an extract from *Cochlospermum angolense* (burututu) on *Plasmodium berghei* in the mouse malaria suppression test. Angew parasitol. 1991; 32(1), 7-9.
101. Presber W, Hegenscheid B, Hernandez-Alvarez H, Herrmann D, Brendel C. Inhibition of the growth of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* *in vitro* by an extract of *Cochlospermum angolense* (Welw.). Acta Tropica. 1992; 50, 331-8.
102. Cook IF, Knox JR. Flavonoids from *Cochlospermum gillivraei*. Phytochemistry Reports. 1975; 14, 2510-11.
103. Janaki B, Sashidhar RB. Physico-chemical analysis of gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): a potential food additive. Food chemistry. 1998; 61(1/2), 231-6.

104. Janaki B, Sashidhar RB. Subchronic (90-day) toxicity study in rats fed gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*). Food chem toxicol. 2000; 38, 523-34.
105. Hirst EL, Dunstan S. the structure of karaya gum (*Cochlospermum gossypium*). J chem soc. 1953; aug., 2332-37.
106. Aspinall GO, Hirst EL, Johnstons MJ. Acidic sugar components of *Cochlospermum gossypium* gum. J chem soc. 1962; jul, 2785.
107. Pereira, T. Avaliação fitoquímica e biológica de diferentes tinturas de *Cochlospermum regium* (algodãozinho). [monografia de graduação]. Campo Grande/MS: Curso de Farmácia, Universidade Anhanguera-Uniderp, 2007.
108. Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. New York : Spring-Verlag, 1984.
109. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA. 58 p. 2003.
110. Oliveira F, Akisue G, Akisue MK. Farmacognosia. São Paulo : Atheneu, 1991.
111. Johansen DA. Plant microtechnique. New York: Graw: Hill, 1940.
112. Souza LA, Rosa SM, Moscheta IS, Mourão KSM, Rodella RA, Rocha DC, Lolis MIGA. Morfologia e anatomia vegetal: células, tecidos, órgãos e plântula. Ponta Grossa: UEPG. 2003.
113. Roth I. Microtécnica vegetal. Caracas: Universidad Central Venezuela, 1964.
114. FARMACOPEIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte 1.
115. Pelissari GP. Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades antibacteriana e imunomoduladora de *Melampodiul divaricatum* (Rich. In Pers.) DC. (Asteraceae).

[dissertação de mestrado]. Araraquara/ SP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2008

116. Volpato AMM. Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico. [tese de doutorado]. Curitiba/ PR: Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná; 2005.

117. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899 de 28 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos (anexo). Diário Oficial da União. Brasília, 28 mai., 2003.

118. Valgas C *et al.* Screening methods to determine antibacterian activity of natural products. *Braz J microbiol.* 2007; 38, 369-80.

119. Cechinel-Filho V, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quim nova.* 1998, 2(1), 99-104.

120. Zuanazzi JAS, Montanha JA. Flavonóides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gusmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR [org.]. *Farmacognosia da planta ao medicamento.* Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

121. Singleton VL. Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Advances in food research.* 1981; 27, 149-217.

122. Kaur S, Grover IS, Kumar S. Antimutagenic potential of ellagic acid isolated from *Terminallia arjuna* Kurtz. *Tetrah lett.* 1990; 31(3), 393-6.

123. Murakami S. Inhibition of gastric H⁺K⁺ ATPase and acid secretion by ellagic acid. *Planta Med.* 1991; 57(4), 305-8.

124. Chung JG. Inhibitory actions of ellagic acid on growth and arylamine N-acetyl-transferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer patients. *Microbios*. 1998; 93(375), 115-27.
125. Solon S, Lopes L, Sousa PT Jr, Schmeda-Hirschmann, G. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. *J Ethnopharmacol*. 2000; 72, 173-8.
126. Krogh R, Yunes RA, Andricopulo AD. Structure-activity relationships for analgesic activity of gallic acid derivatives. *Farmacol*. 2000; 55, 730-5.
127. Martins SM, Huag L, Yang SP, Huang Y, Villanueva J, Greene SL, Arehart K, Sayre C, Johnson RB. Vaginal treatment compositions containing sugar and sugar alcohol actives forming in-site gels for the treatment of vaginal infection. United States patent US 2007026074 A1 20070201. 2007.
128. Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL, Amorim ELC. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quim nova*. 2005; 28(5), 892-6.
129. Solon S. Análises fitoquímica e antioxidante da entrecasca de *Lafoensia pacari* St. Hil. [dissertação de mestrado]. Cuiabá/ MT: Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso; 1998.
130. Silva HR, Silva CCM, Caland-Neto LB, Lopes JAD, Cito AMGL, Chaves MH. Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. *Quim nova*. 2007; 30(8), 1877-81.
131. Santos SC, Mello JCP. Taninos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gusmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR [org.]. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.
132. Silverstein RM, Basler GC, Morrill TC. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

133. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS. Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry. 5 ed. Washington: Saunders Golden Sunburst Series, 1996.
134. Agrawal PK. Carbon-13 NMR of flavonoids. New York: Elsevier, 1989.
135. Souza-Filho APS, Santos RA, Santos LS, Guilhon GMP, Santos AS, Arruda MSP, Muller AH, Arruda AC. Allelopathic potential of *Myrcia guianensis*. *Planta daninha*. 2006; 24(4), 1-15.
136. FARMACOPEIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1996-2003. Parte 2. Fasc. 1-5
137. Kim DO, Chun OK, Kim YJ, Moon HY, Lee CY. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J agric food chem*. 2003; 51, 6509-15.
138. He Z, Xia W. Analysis of phenolic compounds in chinese olive (*Canarium album* L.) fruit by RPHPLC-DAD-ESI-MS. *Food Chemistry*. 2007; 105, 1307-11.
139. Baderschneider B, Winterhalter P. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids and lignans from Riesling Wine and screening for antioxidant activity. *J agric food chem*. 2001; 49, 2788-98.
140. Ceruks M, Romoff P, Favero AO, Lago JH. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebentifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Quim nova*. 2007; 30(3), 597-9.
141. Abad A, San Feliciano A, Lopez-Perez JL, Olmo E. Determinação estrutural de substâncias naturais: aspectos práticos. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO V. *Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia*. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2007.
142. Agrawal PK. NMR. Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*. 1992; 31(10), 3307-33.

143. Regasini LO, Fernandes DC, Castro-Gamboa I, Silva, DHS, Furlan M, Bolzani VS, Barreiro EJ, Cardoso-Lopes, E, Young MCM, Torres LB, Velloso, JCR, Oliveira OMM. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). Quim nova. 2008; 31(Impresso), 802-6.

144. Iwashina T, Githiri MS, Benitez ER, Takemura T, Kitajima J, Takahashi R. Analysis of flavonoids in flower petals of soybean near-isogenic lines for flower and pubescence color genes. J. heredity. 2007; 98(3), 250-7.

145. Sonaglio D, Ortega GG, Petrovick PR, Bassani VL. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gusmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR [org.]. Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

146. Fisher DCH. Controle de qualidade de matérias-primas vegetais e fitoterápicos. In: Gil ES, Orlando R, Matias R, Serrano [org.]. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. Campo Grande/ MS: Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, 2005.

147. Marques LC, Vigo CLS. Preparação e padronização de extratos vegetais. In: Leite JPV [org.]. Fitoterapia bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Atheneu, 2009.

148. Rocha LM. Controle de qualidade de produtos fitoterápicos. In: Sharapin N. [org.] Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos. Santafé de Bogotá: CYTED, 2000.

149. Rocha LM. Controle de qualidade de drogas vegetais e fitoterápicos. In: Leite JPV [org.]. Fitoterapia bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Atheneu, 2009.

150. Pansera MR, Santos ACA, Paese K, Wasum R, Rossato M, Rota LD Pauletti GF, Serafini LA. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul. Rev bras farmacogn. 2003; 13(1), 17-22.

151. Alves MM, Mendes PC, Barbosa WR, Pereira NL, Silva-Júnior JOC. Caracterização físico-química de *Arrabidaea chica* (H & B) Verlot. J bras fitomedicina. 2007; 5(4), 261.
152. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quim nova. 2007; 30(2), 374-81.
153. Martins AR, Melloti M, Glória BA. Análise microscópica da droga pulverizada e triagem fitoquímica de extratos de *Smilax polyantha* Grisebach (Smilacaceae); XIX Simpósio Nacional de Plantas Medicinais, 2003.
154. Marques LC, Pieri C, Rooman-Júnior WA, Cardoso MLC, Milaneze-Gutierrez MA, Mello JCP. Controle farmacognóstico das raízes de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (Malpighiaceae). Rev bras farmacogn. 2007; 17(4), 604-15.
155. Sharapin N. Controle de qualidade de plantas medicinais e fitofármacos – prescrições farmacopéicas. In: Sharapin N. [org.] Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos. Santafé de Bogotá: CYTED, 2000.
156. Vilegas W, Cardoso CAL. Controle de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais. In: Yunes RA, Cechinel-Filho V. [org.]. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2007.
157. Govindarajan R, Singh DP, Rawat AKS. High-performance liquid chromatographic method for the quantification of phenolic in “Chyavanprash” a potent Ayurvedic drug. J pharmac biom analysis. 2007; 43, 527-32.
158. Souza KCB. Avaliação biológica de preparações obtidas a partir das inflorescências de *Achyrocline satureoides* (Lam.) D. C. (marcela). [tese de doutorado]. Porto Alegre/ RGS: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2002.
159. Vogel AI. Vogel's textbook of practical organic chemistry. 5 ed. Longman Scientific & Technical: UK, 1989.

160. Gil ES, Matias R. Métodos espectrométricos. In: Gil ES, Orlando R; Matias, R, Serrano [org]. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. Campo Grande/ MS: Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, 2005.
161. Markham KR. Techniques of flavonoid identification. New York: Academic Press, 1982.
162. Mira, NUM, Barros RMC, Schiocchet MA, Noldin JÁ, Lanfer-Marquez UM. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L). Ciênc tecnol aliment; 28(4), 994-1002, 2008.
163. Paiva SR, Fontoura LA, Figueiredo MR, Mazzei JL, Kaplan MAC. Perfil cromatográfico de duas espécies de Plumbaginaceae: *Plumbago scandens* L. e *Plumbago auriculata* LAM. Quim nova. 2002; 25(5), 717-21.
164. Ciola R. Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho HPLC. São Paulo: Edgard Blücher, 1998.
165. Coutinho ID. Estudo químico de óleos essenciais e extratos das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). [dissertação de mestrado]. Campo Grande/ MS: Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2008.
166. Queiroz SCN, Collins CH, Jardim ICSF. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. Quim nova. 2001; 24(1), 68-76.
167. Markom M, Hasan M, Daud WRW, Singh H, Jahim JM. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: effects of solvents and extraction methods. Separation and Purification Technology. 2007; 52, 487-96.

168. Celeghini RMS, Vilegas JHY, Lanças FM. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng. ("guaco") leaves. J braz chem soc. 2001; 12(6), 706-9.
169. Proestos C, Komaitis M. Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: comparison with conventional extraction techniques. J food quality. 2006; 29, 567-82.
170. Carollo CA. Análise fitoquímica e avaliação dos efeitos dos tipos de adubação, da radiação solar e do estresse hídrico, no acúmulo de metabólitos secundários em espécies do gênero *Mikania*. [tese de doutorado]. Ribeirão Preto/ SP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2008.
171. Rangkadilok N, Sitthimanchai S, Worasuttayangkurn L, Mahidol C, Ruchirawat M, Satayavivad J. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. Food chem toxicol. 2007; 45, 328-36.
172. Vieira RF, Grayer RJ, Patonb A, Simon JE. Uso de marcadores químicos na estudo da diversidade genética de *Ocimum gratissimum* L. Rev bras farmacogn. 2002; 12(supl.), 126-9.
173. Santos RI. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gusmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR [org.]. Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.
174. Kim DO, Chun OK, Kim YJ, Moon HY, Lee CY. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plumbs. J agric food chem. 2003; 51, 6509-15.
175. Markom M, Hasan M, Daud WR, Singh H, Jahim JM. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: effects of solvents and extraction methods. Separat purificat technol. 2007;52, 487-96.

176. Rangkadilok N, Sitthimonchai S, Worasuttayangkurn L, Mahidol C, Ruchirawat M, Satayavidad J. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. *Food chem toxicol.* 2007; 45, 328-36.