

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

SORAYA SOLON

Análises fitoquímica e farmacognóstica da raiz de
Cochlospermum regium (Mart. et Schr.) Pilger,
Cochlospermaceae.

**Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.**

Orientador: Prof. Dr. João Máximo de Siqueira

**CAMPO GRANDE, MS
2009**

SORAYA SOLON

Análises fitoquímica e farmacognóstica da raiz de *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr.) Pilger, Cochlospermaceae.

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 25 de setembro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. João Máximo de Siqueira - presidente
Universidade Federal de São João Del Rey**

**Profª Drª Damaris Silveira
Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

**Profª Drª Neli Kika Honda
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

**Profª Drª Maria Lúcia Ivo
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Este trabalho é dedicado para minhas filhas, Maria Luíza e Ana Júlia, que são a mais intensa força de motivação da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por possibilitar esta experiência em minha vida;

Aos meus familiares, em especial, minha mãe, Marina (irmã) e Carla (cunhada), por cuidarem e alegrarem minhas filhas durante minha ausência;

Ao meu pai, meu marido e minhas filhas, por torcerem por mim;

Ao meu orientador Prof. Dr. João Máximo de Siqueira, pela confiança, pelo incentivo, pelos ensinamentos e pela amizade;

Aos membros das bancas de qualificação Prof. Dr. Jonas da Silva Mota, Prof^a Dr^a Najla Mohamed Kassab e Prof^a Dr^a Maria de Fátima C. Matos, e aos membros da banca de defesa Prof^a Dr^a Neli Kika Honda, Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo, Prof^a Dr^a Damaris Silveira, Prof^a Dr^a Maria Lúcia Ivo, pelas valiosas contribuições;

À Prof^a Cristiana Santos de Macedo, pela orientação sobre a análise microbiológica e por disponibilizar o Laboratório de Microbiologia Humana da Universidade Anhanguera-Uniderp para a realização dos experimentos antimicrobianos;

Ao Prof. Carlos Alexandre Carollo, por disponibilizar o Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul para realização dos ensaios cromatográficos em CLAE-DAD;

À Prof. MSc Ubirazilda Maria Resende, pelos ensinamentos sobre morfo-anatomia vegetal e pelas sugestões na construção dos textos relacionados;

À Prof^a Dr^a Doroty Dourado, por ceder o Laboratório de Pesquisa em Histopatologia da Universidade Anhanguera-Uniderp para a fotodocumentação das lâminas histológicas;

Ao técnico Marlos Ferreira Dornas e seu auxiliar Alípio de Castro (*in memoriam*), do Curso de Agronomia da Universidade Anhanguera-Uniderp, pelo auxílio na coleta do material vegetal;

À Izabel Cristina Casanova Turatti e ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, do Laboratório de Química Orgânica, Departamento de Físico-Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela análise em CG-EM;

À técnica MSc. Luciana Marçal Ravaglia, à Profª Drª Gláucia Braz Alcantara, ao Prof. Dr. Joaquim Corsino e ao Prof. Dr. Walmir Garcez, do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelos experimentos em RMN e discussões sobre os espectros obtidos;

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello e Prof. Dr. Guillermo Schmeda Hirschmann, pela contribuição na elucidação estrutural de algumas substâncias isoladas;

À Profª Drª Cláudia Andréa Lima Cardoso, da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, pelo auxílio nos experimentos por CLAE-DAD;

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Luís Fabrício Gardini Brandão, Nídia Cristiane Yoshida, Daniel Demarque e Ricardo Pereira Rodrigues, pela amizade e experiências divididas;

Às alunas da Universidade Anhanguera-Uniderp, Gabriela Leite Nabhan e Tatiane Pereira, por auxiliarem em alguns ensaios físico-químicos;

Às técnicas da Universidade Anhanguera-Uniderp, Lucimar Aparecida de Carvalho, Suely Marques de Mattos, Angélica Ávila e Evaneza Francisco de Paula, pela disponibilidade e contribuição em vários experimentos;

À secretária Vera Nascimento Silva, do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo auxílio administrativo durante todo o período da pós-graduação;

À secretária Sabrine, do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, pela atenção e gentileza que diminuíram sobremaneira a tensão durante o processo final de conclusão deste trabalho;

À Coordenação do Curso de Farmácia da Universidade Anhanguera-Uniderp, nas gestões da Profª Drª Mônica Cristina Toffoli Kadri, Prof. MSc. Normandis Cardoso Filho e Profª MSc. Vivianne Landgraff de Castro, pelo incentivo durante todo o tempo em que estive envolvida com o desenvolvimento deste trabalho;

À Fundação Manoel de Barros (FMB) e Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se não fosse uma gota.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Esta pesquisa se comprometeu a pesquisar os aspectos fitoquímicos e farmacognósticos da raiz de *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr.) visando adquirir informações auxiliares para sua padronização como matéria-prima vegetal para produção de fitoterápicos. Para análise fitoquímica foi realizado o fracionamento do extrato hidroalcoólico associado com a atividade antimicrobiana e, para o estudo farmacognóstico foram realizados ensaios para caracterização morfoanatômica e físico-química seguindo método farmacopéico. O extrato hidroalcoólico e suas frações, particularmente a fração acetato de etila, apresentaram efeito antimicrobiano frente à *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e ausência de atividade sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae*. O fracionamento químico forneceu cinco derivados fenólicos [ácido elágico, ácido gálico, 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 as substâncias isoladas são reportadas nesta espécie e o registro do diidrokaempferol-3-O- β -(6''-galoil)-glicopiranosídeo é inédito na literatura. A presença dos ácidos fenólicos ratifica a ação antimicrobiana observada no extrato hidroalcoólico e frações mais polares de *C. regium*, além de dar sustentação ao uso tradicional da raiz para o tratamento de infecções. O estudo farmacognóstico caracterizou a raiz de *C. regium* em crescimento secundário com região cortical menos desenvolvida, presença de grãos de amido, drusas, polifenóis e bolsas oleosas. 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, o 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.

Palavras-chave: *Cochlospermum regium*; Cochlospermaceae; fitoquímica; análise farmacognóstica; antimicrobiano.

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the phytochemical and pharmacognostic features of the roots of *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr.) Pilger in order to acquire ancillary information to support its standardization as a raw material for the production of phytotherapeutic preparations. Phytochemical analysis was based on the fractionation of its hydroalcoholic extract exhibiting antimicrobial activity. The pharmacognostic investigation involved morphoanatomical and physicochemical characterization using pharmacopea methods. The hydroalcoholic extract and its fractions, particularly the ethyl acetate fraction, had antimicrobial effect on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, but not on *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, or *Klebsiella pneumoniae*. Phytochemical investigation of the hydroalcoholic extract supplied five phenolic derivatives [ellagic acid, gallic acid, dihydrokaempferol, dihydrokaempferol-3-O- β -glucopyranoside and dihydrokaempferol-3-O- β -(6''-galloyl)-glucopyranoside dihydrokaempferol] and two triacyl benzenes known as cochlospermines A and B. Excluding dihydrokaempferol and its glycoside, the compounds described are being isolated from this species for the first time. Dihydrokaempferol-3-O- β -(6''-galloyl)- β -glucopyranoside was unpublished. The presence of phenolic acids corroborates the antimicrobial activity observed in the hydroalcoholic extract and the polar fractions extracted from roots. It also corroborates traditional usage of the roots for the treatment of infections. The pharmacognostic study revealed secondary growth roots to have a less developed cortical region, with the presence of starch grains, druses, polyphenols, and oil pockets. The powdered drug had average particle size of 0.285 mm, bulk density of 0.40 g/mL, compaction density of 0.62 g/mL, and humidity, total ash content, and acid-insoluble ash contents of 8.2%, 3.1%, and 0.08%, respectively. Fingerprint was determined by TLC and HPLC-DAD (gradient mode) using gallic acid, ellagic acid, and dihydrokaempferol-3-O- β -glucopyranoside as markers. Quantification of the last two compounds revealed average contents of 27.9 and 1.8 mg/g, respectively. No significant seasonal variability was observed for the species during 2008.

Keywords: *Cochlospermum regium*; Cochlopermaceae; phytochemistry; pharmacognostic analysis; antimicrobials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Partes aéreas de <i>C. regium</i> em habitat natural (mata nativa do <i>Campus</i> III, Universidade Anhanguera-Uniderp).....	30
Figura 2 -	Partes aéreas de <i>C. regium</i> em período de floração (mata nativa do <i>Campus</i> III, Universidade Anhanguera-Uniderp).....	30
Figura 3 -	Ramos frutificados de <i>C. regium</i> . A) Fruto capsular fechado; B) Fruto capsular aberto permitindo a visualização da semente pilosa.....	31
Figura 4 -	Sementes de <i>C. regium</i> . A) Sementes com pêlo, B) Sementes sem pêlo.....	31
Figura 5 -	Coleta da raiz de <i>C. regium</i> do seu habitat natural (mata nativa do <i>Campus</i> III, Universidade Anhanguera-Uniderp).....	32
Figura 6 -	Ilustração da secção transversal da raiz de <i>C. regium</i> com estrutura secundária estabelecida.....	33
Figura 7 -	Ilustração da secção transversal do caule de <i>C. regium</i> . A – Estrutura primária; B – Estrutura secundária.....	34
Figura 8 -	Raiz de <i>C. regium</i> após coleta e retirada da casca conforme orientação para uso medicinal.....	36
Figura 9 -	Apresentação comercial de <i>C. regium</i> disponível no Mercado Municipal de Campo Grande/ MS. A) Produto embalado e rotulado; B) Conteúdo interno.....	37
Figura 10-	Metabólitos secundários isolados da raiz de <i>C. regium</i> : diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo [1], kaempferol [2], naringenina [3], aromadendrina [4] e 1-hidroxitetradecan-3-ona [5].....	41
Figura 11-	Ilustração dos elementos histológicos da raiz de <i>C. regium</i> que devem ser encontrados na diagnose da droga pulverizada.....	43
Figura 12-	Estruturas moleculares de alguns metabólitos secundários isolados de <i>C. tinctorium</i>	45
Figura 13-	Alguns metabólitos secundários isolados de <i>C. vitifolium</i> : cochlospermina C [19], excelsina [20], pinosinol [21].....	46
Figura 14-	Substâncias isoladas da raiz de <i>C. planchonii</i> : cochlospermina A [22], B [23] e D [24].....	48
Figura 15-	Substâncias isoladas da raiz de <i>C. gillivraei</i> : apigenina [26] e	

	afzelequina [27] e os glicosídeos prunina [28], cosmosiina [29].	49
Figura 16-	Raiz de <i>C. regium</i> após coleta, limpeza, retirada da casca e corte manual.....	51
Figura 17-	Fracionamento do extrato bruto hidroetanólico da raiz de <i>C. regium</i> resultando no isolamento da substância 1	54
Figura 18-	Separação cromatográfica da fração acetato de etila da raiz de <i>C. regium</i> resultando no isolamento das substâncias 1 - 6	55
Figura 19-	Estrutura molecular da substância 1 (ácido elágico).....	70
Figura 20-	Expansão do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 1 , na região entre δ 1,3 e 8,5.....	71
Figura 21-	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 1	72
Figura 22-	Expansão do espectro de DEPT 135° (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 1 , na região entre δ 95 e 170.....	72
Figura 23-	Espectro de massas da substância 1 no modo de íon negativo..	73
Figura 24-	Estrutura molecular da substância 2 (diidrokaempferol).....	75
Figura 25-	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da substância 2 e expansão na região entre δ 0,5 e 8,0.....	76
Figura 26-	Espectros de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) da substância 2	76
Figura 27-	Espectros de DEPT 135° (75 MHz, CDCl ₃) da substância 2	77
Figura 28-	Espectro de massas da substância 2 em modo de detecção negativo.....	77
Figura 29-	Estrutura molecular da substância 3 (ácido gálico).....	78
Figura 30-	Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) da substância 3	79
Figura 31-	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, C ₃ D ₆ O) da substância 3	80
Figura 32-	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, C ₃ D ₆ O) da substância 3	80
Figura 33-	Espectro de DEPT 135° (75 MHz, C ₃ D ₆ O) da substância 3	80
Figura 34-	Estrutura molecular da substância 4 (galato de etila).....	82
Figura 35-	Espectro de massas da substância 4 no modo de ionização negativo.....	83
Figura 36-	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) da substância 4 com expansões das regiões entre δ 4,0 - 4,4 e δ 1,1-1,6.....	84

Figura 37-	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD) da substância 4	84
Figura 38-	Espectro de DEPT 135° (75 MHz, CD ₃ OD) da substância 4	85
Figura 39-	Mapa de contornos de gHSQC (300 MHz/ 75 MHz, CD ₃ OD) da substância 4	86
Figura 40-	Mapa de contornos gHMBC (300 MHz/ 75 MHz, CD ₃ OD) da substância 4	87
Figura 41-	Cromatogramas por CLAE-UV/Vis empregando coluna C-18, mistura de acetonitrila:água (1:1), fluxo de 1 mL/ min. e detecção em 270 nm. (A) galato de etila; (B) ácido gálico; (C) extrato metanólico da raiz de <i>C. regium</i>	88
Figura 42-	Estrutura molecular de 5 (diidrokaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo).....	42
Figura 43-	Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr) da substância 5	92
Figura 44-	Espectro de massas da substância 5 em modo de ionização negativo.....	92
Figura 45-	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) da substância 5	93
Figura 46-	Espectro de RMN ¹³ C (300 MHz, CD ₃ OD) da substância 5	93
Figura 47-	Expansões do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) da substância 5 , nas regiões entre δ 2,0–8,0; 6,5-7,7; 4,6-6,0 e 2,8-4,2.....	94
Figura 48-	Expansões do espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD) da substância 5 , nas regiões entre δ 60-195, 140-195 e 55-140.....	95
Figura 49-	Espectro de DEPT 135° (75 MHz, CD ₃ OD) da substância 5 e ampliação na região entre δ 60 e 140.....	96
Figura 50-	Espectro de gHSQC (300 MHz/75 MHz, CD ₃ OD) da substância 5	97
Figura 51-	Ampliações do espectro de gHSQC (300 MHz/75 MHz, CD ₃ OD) da substância 5 , nas regiões entre δ 2,8-5,4 x 45-105; 2,8-4,0 x 70-85 e 4,5-5,5 x 74-89.....	98
Figura 52-	Espectro de gHMBC (300 MHz/75 MHz, CD ₃ OD) da substância 5 e ampliações as regiões entre δ 3,5-6,0 x 70-90 e 6,3-8,0 x 100-180.....	99
Figura 53-	Proposta para estrutura molecular da substância 6	

	[diidrokaempferol-3-O-β-(6''galoil)-glicopiranosídeo].....	101
Figura 54-	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) da substância 6	103
Figura 55-	Espectro de RMN ¹³ C (300 MHz, CD ₃ OD) da substância 6	103
Figura 56-	Expansões do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) da substância 6 , nas regiões entre δ 1,0–8,0; 6,5-7,3; 4,0-6,2 e 2,5-4,5.....	104
Figura 57-	Expansões do espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD) da substância 6 , nas regiões entre δ 105-200, 25-120 e 24-145.....	105
Figura 58-	Espectro de DEPT 135° (75 MHz, CD ₃ OD) da substância 6 e ampliação na região entre δ 10 e 170.....	106
Figura 59-	Espectro gHSQC (300 MHz/75 MHz, CD ₃ OD) da substância 6 .	107
Figura 60-	Ampliações do espectro de gHSQC (300 MHz/75 MHz, CD ₃ OD) 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.....	108
Figura 61-	Espectro gHMBC (300 MHz/75 MHz, CD ₃ OD) da substância 6 .	109
Figura 62-	Ampliações do espectro gHMBC (300 MHz/75 MHz, CD ₃ OD) 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.....	110
Figura 63-	Espectro de massas da substância 6 no modo de ionização negativo.....	111
Figura 64-	Cristais aciculares da misturas das substância 7 e 8 obtida após resfriamento da solução hidroetanólica de <i>C. regium</i> .	112
Figura 65-	Estrutura molecular da substância 7 (cochlospermina A) e 8 (cochlospermina B).....	113
Figura 66-	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da mistura de 7 e 8	115
Figura 67-	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) da mistura de 7 e 8	115
Figura 68-	Expansões do espectro de RMN ¹ H (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.....	116
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.....	117
Figura 70-	Espectro de DEPT 135° (75 MHz, CDCl ₃) da mistura de 7 e 8	117
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.....	118

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.....	119
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.....	120
Figura 74-	Espectro de massas da substância 7 em modo de ionização por impacto de Elétron a 70 eV.....	120
Figura 75-	Espectro de massas da substância 8 em modo de ionização por impacto de elétron a 70 eV.....	121
Figura 76-	Raiz de <i>C. regium</i> após coleta, limpeza, retirada da casa e corte manual.....	123
Figura 77-	Corte da raiz de <i>C. regium</i> com facão de poda provocando complexação de taninos.....	124
Figura 78-	Secção transversal na região cortical da raiz de <i>C. regium</i> 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).....	124
Figura 79-	Secção transversal da região cortical da raiz de <i>C. regium</i> (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).....	125
Figura 80-	Secção transversal da região cortical da raiz de <i>C. regium</i> (lâminas extemporâneas) evidenciando células com conteúdo fenólico e bolsa oleosa após coloração com cloreto férrico (A) (M.O. 10x).....	126
Figura 81-	Secção transversal da região floemática da raiz de <i>C. regium</i> (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).....	127
Figura 82-	Secção transversal da região do xilema secundário da raiz de <i>C. regium</i> 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).....	128

Figura 83-	Secção transversal da região do xilema secundário da raiz de <i>C. regium</i> (lâmina permanente) evidenciando vasos solitários e agrupados (M.O. 40x).....	129
Figura 84-	Secção transversal da região do xilema secundário da raiz de <i>C. regium</i> (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).....	129
Figura 85-	Distribuição do tamanho das partículas da raiz de <i>C. regium</i> pulverizada em moinho de facas com peneira de 2 mm.....	131
Figura 86-	Perfil cromatográfico por CCD da raiz de <i>C. regium</i> , 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).....	137
Figura 87-	Perfil cromatográfico por CCD da raiz de <i>C. regium</i> , 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).....	138
Figura 88-	Espectros de absorção na região UV/Vis (200-600 nm) de alguns padrões de ácidos fenólicos comumente presentes em plantas medicinais.....	139
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.....	140
Figura 90-	Perfil cromatográfico por CLAE-UV/Vis do extrato hidroalcoólico da raiz de <i>C. regium</i> , empregando coluna C-18, mistura de metanol:ácido fosfórico 0,16 M (1:1), fluxo de 1 mL/ min. e detecção em 362 nm.....	141
Figura 91-	Perfil cromatográfico por CLAE-UV/Vis do extrato hidroalcoólico da raiz de <i>C. regium</i> , empregando coluna C-18, mistura de metanol:ácido fosfórico 0,16 M (1:1), fluxo de 1 mL/ min. e detecção em 254 nm.....	142
Figura 92-	Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do infuso aquoso da raiz de <i>C. regium</i> 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).....	143
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.....	144
Figura 94-	Perfil cromatográfico e espectros de absorção na região do UV/Vis do infuso da raiz de <i>C. regium</i> , 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.....	145
Figura 95-	Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do extrato hidrometanólico da raiz de <i>C. regium</i> , 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.....	147
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.....	149
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.....	150
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.....	150

Figura 99-	Perfis cromatográficos, por CLAE-DAD, da raiz de <i>C. regium</i> 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.....	151
Figura 100-	Concentração (mg/ g) do diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo e do ácido gálico nas raízes secas de <i>C. regium</i> coletadas em fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro/ 2008.....	154
Figura 101-	Biossíntese de metabólitos secundários a partir da glicose enfatizando a formação de ácido gálico e flavonóides.....	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Constituintes químicos voláteis identificados nos óleos essenciais da folha e raiz (casca e lenho) de <i>C. vitifolium</i> , através de CG/ MS.....	47
Tabela 2 -	Rendimento (% p/p) das frações obtidas por partição no extrato hidroalcoólico e na raiz seca de <i>C. regium</i>	67
Tabela 3 -	Potencial antimicrobiano de diferentes frações obtidas da raiz de <i>C. regium</i> frente a <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	68
Tabela 4 -	Potencial antimicrobiano das substâncias 1 , 3 e 5 isoladas da raiz de <i>C. regium</i> frente a <i>S. aureus</i>	69
Tabela 5 -	Comparação entre os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) da substância 1 e dados da literatura para o ácido elágico.....	71
Tabela 6 -	Comparação entre os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) da substância 2 e dados da literatura para o diidrokaempferol.....	75
Tabela 7 -	Comparação entre os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) da substância 3 e dados da literatura para o ácido gálico.....	79
Tabela 8 -	Comparação entre os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) da substância 4 e dados da literatura para galato de etila, e correlação direta heteronuclear entre ^1H e ^{13}C (gHSQC).....	83
Tabela 9 -	Comparação entre os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) da substância 5 e dados da literatura para o diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo.....	91
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...	102
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).....	114
Tabela 12 -	Teor de massa (%) retida e acumulada da raiz seca de <i>C. regium</i> pulverizada em moinho elétrico de facas acoplado com tela de 2 mm, coletada nos meses de fevereiro, abril	

	e junho, de 2008.....	131
Tabela 13 -	Valores da densidade aparente e por compactação da raiz de <i>C. regium</i> pulverizada em moinho elétrico de facas acoplado com peneira de 2 mm, coletada nos meses de fevereiro, abril, agosto, outubro e dezembro/ 2008.....	132
Tabela 14 -	Teor de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido para raiz de <i>C. regium</i> coletada nos meses de fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro/ 2008...	134
Tabela 15 -	Padrão de estabilidade do extrato hidrometanólico da raiz de <i>C. regium</i> antes e após repouso de 72 h, armazenado em luz e temperatura ambiente, através da análise dos picos obtidos por CLAE-DAD.....	148
Tabela 16 -	Comparação do número e área total de picos detectados por CLAE-DAD (266, 294 e 360 nm), em raízes seca de <i>C. regium</i> coletadas em fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro/ 2008.....	152
Tabela 17 -	Área do pico do diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo, obtido por CLAE-DAD (294 nm), em raiz seca de <i>C. regium</i> coletadas em fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro/ 2008.....	152
Tabela 18 -	Concentração do diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo (mg/ g) em raiz seca de <i>C. regium</i> coletadas em fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro/ 2008.....	153
Tabela 19 -	Área do pico do ácido gálico, obtido por CLAE-DAD (266 nm), em raiz seca de <i>C. regium</i> coletadas em fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro/ 2008.....	153
Tabela 20 -	Concentração de ácido gálico (mg/ g) em raiz seca de <i>C. regium</i> coletadas em fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro/ 2008.....	153

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Informações etnofarmacológicas sobre <i>C. regium</i> em comunidades dos Estados de Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS) e Goiás (GO).....	36
Quadro 2 -	Teor de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis de algumas drogas farmacopêicas.....	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
C₃D₆O	Acetona deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
CHCl₃	Clorofórmio
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detecto de arranjo de diodos
d	Dupleto
DAD	Detector de arranjo de diodos
dd	Duplo dupleto
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DL₅₀	Dose letal média
DMSO	Sulfóxido de metila
DMSO-<i>d</i>₆	Sulfóxido de metila deuterado
DPPH	1,1 difenil picrilhidrazila
EC50	Concentração eficaz média
EM	Espectro de massas
EtOH	Etanol
FAA	Formol – álcool-ácido acético
FB	Farmacopéia Brasileira
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
Hex	Hexano

INT	indicador de oxi-redução cloreto 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolium
IV	Espectro de absorção na região do infravermelho
J	Constante de acoplamento
m	Multiplete
M.O.	Microscópio óptico
m/z	Relação carga/ massa
NP/ PEG	Reagente <i>Natural Products</i> (aminoetiléster difenilborínico/ polietilenoglicol)
PA	Padrão analítico
ppm	Partes por milhão
q	Quarteto
r	Coefficiente de correlação linear
Rf	Fator de retenção
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RPM	Rotações por minuto
s	Simpleto
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
Tr	Tempo de retenção
UV	Espectro de absorção na região do ultravioleta
UV/VIS	Espectro de absorção na região do ultravioleta/ visível
v.ip.	Via intraperitoneal
v.o.	Via oral
VIS	Visível
δ	Deslocamento químico em partes por milhão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 Posição taxonômica e distribuição geográfica de <i>C. regium</i>	27
2.2 Características botânicas de <i>C. regium</i>	28
2.3 Estudos etnofarmacológicos de <i>C. regium</i>	35
2.4 Informações científicas relacionadas ao uso medicinal de <i>C. regium</i> ..	38
2.4.1 Investigações biológicas e químicas.....	38
2.4.2 Investigações farmacognósticas.....	42
2.5 Interesse medicinal e estudos científicos sobre outras espécies do gênero <i>Cochlospermum</i>	44
3 OBJETIVOS.....	50
3.1 Objetivo geral.....	50
3.2 Objetivos específicos.....	50
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 Fracionamento químico e ensaio antimicrobiano.....	51
4.1.1 Material botânico.....	51
4.1.2 Fracionamento químico.....	52
4.1.2.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico, frações e substância 1	52
4.1.2.2 Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila.....	52
4.1.2.3 Obtenção das substâncias 7 e 8	53
4.1.2.4 Material e métodos empregados para análise das frações e substâncias isoladas.....	56
4.1.3 Determinação da capacidade antimicrobiana.....	58
4.2 Determinação dos parâmetros farmacognósticos.....	59
4.2.1 Material botânico.....	59
4.2.2 Características organolépticas e descrição botânica.....	60
4.2.3 Parâmetros físico-químicos.....	61
4.2.3.1 Distribuição granulométrica do pó, densidade aparente e por	

compactação.....	61
4.2.3.2 Determinação de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido.....	61
4.2.3.3 Perfil cromatográfico (<i>fingerprint</i>).....	62
4.2.3.3.1 Por cromatografia em camada delgada.....	62
4.2.3.3.2 Por cromatografia líquida de alta eficiência.....	63
4.2.3.4 Teor de ácido gálico e diidrokaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo....	64
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
5.1 Fracionamento químico e atividade antimicrobiana.....	65
5.2 Características químicas e elucidação estrutural das substâncias isoladas da raiz de <i>C. regium</i>	69
5.2.1 Substância 1.....	69
5.2.2 Substância 2.....	73
5.2.3 Substância 3.....	78
5.2.4 Substância 4.....	81
5.2.5 Substância 5.....	89
5.2.6 Substância 6.....	100
5.2.7 Substâncias 7 e 8.....	112
5.3 Determinação dos parâmetros farmacognósticos.....	122
5.3.1 Características organolépticas e descrição botânica.....	123
5.3.2 Parâmetros físico-químicos.....	130
5.3.2.1 Distribuição granulométrica do pó, densidade aparente e por compactação.....	130
5.3.2.2 Umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido.....	133
5.3.2.3 Perfil cromatográfico (<i>fingerprint</i>).....	135
5.3.2.4 Teor de ácido gálico e diidrokaempferol-3-O-β-glucopiranosídeo...	145
5.3.2.5 Considerações sobre a análise de autenticidade e integridade química da raiz de <i>C. regium</i>	156
6 CONCLUSÃO.....	157
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	158

1 INTRODUÇÃO

O retomado interesse mundial pelos fitoterápicos tem alavancado inúmeros estudos que visam consolidar a fitoterapia através de evidências científicas para, principalmente, garantir a eficiência dos efeitos terapêuticos e verificar o possível potencial tóxico das matérias-primas vegetais e do fitoterápico (1, 2, 3, 4, 5).

Atualmente, a fitoterapia mostra-se bem estabelecida no sistema de saúde europeu, com destaque na Alemanha e França, onde há aceitação tanto dos pacientes como da classe médica (6). Ainda conforme esses autores, 80% dos médicos da Alemanha indicam regularmente medicamentos a base de vegetais em consequência do evoluído sistema normativo e científico que esse país adota, somente permitindo a comercialização dos fitoterápicos após a comprovação absoluta de sua segurança e a certeza razoável de sua eficácia.

Seguindo o mesmo direcionamento, desde 1994, vigora no Brasil um rigor legal que normatiza a produção de fitoterápicos (7, 8, 9). Tal situação é reflexo do uso incorreto e abusivo de plantas medicinais induzido, desde a década de 1970, pela concepção equivocada de que “produto natural não faz mal” e pelas estratégias de *marketing* de alguns laboratórios farmacêuticos (10, 11). Casos importantes como a comprovação da hepatotoxicidade do confrei (*Symphytum officinale*) após o uso empírico da população brasileira, inclusive de medicamentos formulados com esta droga, reforçou a posição do Ministério da Saúde na adequação de normas mais efetivas sobre esse assunto culminando na atual Resolução nº 48 (16/03/2004), que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos industrializados (5, 9, 11).

Em outro contexto, a disposição governamental para regulamentar a fitoterapia no SUS é notada desde a década de 80 a partir da Resolução Ciplan nº8/88 existindo, em 2006, programas estaduais e municipais que a adotam em 116 municípios sendo 22 unidades federadas (12). Nesta data, o governo brasileiro aprovou a “Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS)” através da Portaria nº 971 (03/05/2006) incluindo a fitoterapia, homeopatia, medicina tradicional chinesa e crenoterapia como práticas que devem ser oferecidas pelo sistema público determinando, ainda, diretrizes para que estas práticas sejam estabelecidas (12). Entre as diretrizes apontadas pela Portaria nº 971, o governo brasileiro objetiva elaborar a “Relação Nacional de

Plantas Medicinais e Fitoterápicos” incluindo ou excluindo as espécies vegetais através do conhecimento sobre a eficácia e segurança, consolidando a acuidade que o Ministério da Saúde adota para os medicamentos naturais.

Nesse caminho, o conhecimento a ser adquirido é amplo e vinculado a rigores semelhantes aos exigidos para produção dos medicamentos de síntese. No setor farmacêutico é estabelecido que, independente da origem (sintética, semi-sintética, vegetal ou animal), qualquer matéria-prima medicamentosa deve ser eficiente, segura e possuir qualidade constante satisfazendo as exigências de autenticidade, estabilidade, pureza e integridade, conforme definido pelas normas oficiais. Esta situação garante lotes padronizados com concentração constante de substâncias ativas e capazes de promover o mesmo efeito terapêutico (1, 13-15).

A obtenção do produto vegetal padronizado depende de inúmeras variáveis que envolvem desde o cultivo, processamento da droga e do produto intermediário até a incorporação na forma farmacêutica final, tornando essa busca bastante árdua, demorada e vinculada ao conhecimento de diferentes áreas de atuação (5, 17, 18). Tal fato se traduz no precário número de espécies medicinais que possuem todos os parâmetros analíticos e produtivos já definidos, com destaque para o ginko (*Ginkgo biloba*), hipérico (*Hypericum perforatum*), kava-kava (*Piper methysicum*), valeriana (*Valeriana officinalis*), pelo aprimoramento analítico e tecnológico capaz de enriquecer as classes químicas ativas e diminuir as substâncias indesejáveis (18). Já no Brasil, Marques (5) enfatiza a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), guaraná (*Paullinia cupana*), guaco (*Mikania glomerata*), macela (*Achyrocline satureoides*) e quebra-pedra (*Phyllanthus tenellus*) como espécies cientificamente conhecidas estando, com exceção do guaco, já incluídas na Farmacopéia Brasileira IV. Somando-se a elas, estão disponíveis as monografias farmacopêicas do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), goiabeira (*Psidium guajava*), carqueja (*Baccharis trimera*), pitangueira (*Eugenia uniflora*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e outros.

No âmbito das drogas nacionais, a deficiência de informações sobre as plantas regionais é ainda mais evidente. Esta afirmação é exemplificada pelo conhecimento ainda insuficiente sobre a raiz de *Cochlospermum regium* que, segundo Nunes *et al.* (19) e Morais *et al.* (20), está incluída entre as drogas vegetais de maior importância no comércio de raizeiros das regiões metropolitanas de Campo Grande/ MS e Goiânia/ GO, respectivamente.

Com o objetivo de adquirir informações auxiliares para a padronização da raiz de *C. regium* como matéria-prima vegetal ativa para produção de fitoterápicos, esta pesquisa determinou as características fitoquímicas e os parâmetros farmacognósticos úteis para a verificação de sua autenticidade, integridade e pureza. Esta proposta atende o contexto normativo nacional que se alicerça na fitoterapia baseada em evidências e fortalece o conhecimento científico sobre uma espécie vegetal nativa do cerrado que possui amplo uso medicinal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 POSIÇÃO TAXONÔMICA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *C. regium*

C. regium é uma dicotiledônea de pequeno porte que integra a família Cochlospermaceae Engler e o gênero *Cochlospermum* Kunth. Há, entretanto, uma indefinição relacionada à filogenia deste gênero que, conforme Barroso (21) e Souza e Lorenzi (22), é integrante da família Bixaceae e não Cochlospermaceae. Os últimos autores informam que:

Alguns autores reconhecem Cochlospermaceae como uma família distinta e mesmo os recentes trabalhos em filogenia não apresentam uma posição definitiva quanto à união ou distinção destas duas famílias (22).

Segundo Melchior citado por Ritto (23), a posição taxonômica desta espécie segue conforme:

17 ^a	Divisão	<i>Angiospermae</i> Brongniart
1 ^a	Classe	<i>Dicotyledoneae</i> De Candolle
1 ^a	Subclasse	<i>Archichlamydeae</i> Engler
34 ^a	Ordem	<i>Violales</i> Melchior
13 ^a	Família	<i>Cochlospermaceae</i> Engler
	Gênero	<i>Cochlospermum</i> Kunth
1 ^a	Seção	<i>Eucochlospermum</i> Planch.
	Espécie	<i>Cochlospermum regium</i> (Mart. et. Schr.) Pilger
	Basônimo	<i>Maximiliana regia</i> Mart. et. Schr.

A família *Cochlospermaceae* Engler é distribuída pelas regiões tropicais do mundo, principalmente, nas Américas e África (24, 25, 26). É constituída apenas pelos gêneros *Amoreuxia* e *Cochlospermum* que fornecem plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas, com flores amarelas dourada, fruto seco capsular e sementes ricamente pilosas, com longos pêlos brancos (24, 25, 26). É comum as

espécies nativas do cerrado apresentarem reservatório de água caracterizado como um grosso xilopódio a fim de favorecer sua adaptação em solo árido (26, 27, 28).

O gênero *Cochlospermum* Kunth é constituído por 11 espécies, porém, no território brasileiro encontra-se somente a *C. regium* e *C. vitifolium* (25, 29, 30, 31, 32).

No Brasil, *C. regium* é comum na vegetação do cerrado e campos da Amazônia, onde é considerada como planta forrageira, ornamental e medicinal. Mostra resistência às queimadas e ao pastejo sobrevivendo nas leiras em solo arenoso, entretanto, é considerada em perigo de extinção pelo governo do Estado do Paraná, enquadrando-se na lista de espécies medicinais ameaçadas, divulgada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (22, 31, 33).

O interesse medicinal associado com o perigo da extinção de *C. regium* tem estimulado estudos agronômicos que objetivam, basicamente, determinar métodos efetivos para superar a dormência da semente e potencializar o processo de germinação possibilitando estabelecer técnicas de cultivo e manejo para assegurar a sobrevivência e disponibilidade deste material genético (34, 35, 36, 37, 38).

Como sinonímia científica de *C. regium* são reconhecidos os nomes: *C. insignis* St. Hill., *C. insigne* A. St.-Hil., *Azeredia pernambucana* Arruda, *Cochlospermum insigne* var. *mattogrossense* Pilg., *Cochlospermum insigne* var. *pohlianum* Eichler, *Cochlospermum tribolum* Standl., *Maximiliana regia* Schrank, *Maximiliana regia* var. *glaberrima* Chadat & Hassl., *Maximiliana regia* var. *mattogrossensis* (Pilg.) S. F. Blake, *Wittelsbachia insignis* Mart. & Zucc., *Amoreuxia unipora* Tiegh. e *Amoreuxia unipora* Tiegh. (39).

2.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DE *C. regium*

Esta espécie é decídua e heliófita, com porte arbustivo podendo atingir até 2 m de altura (Figura 1) (25, 34, 40). O período reprodutivo se inicia em abril com a perda das folhas e o aparecimento de botões florais ocorrendo, a partir do mês de julho, a abertura das flores e o início da frutificação (Figura 2) (25, 34).

Os aspectos morfológicos sobre o sistema subterrâneo, bem como o desenvolvimento anatômico dos órgãos vegetativos e reprodutivos são detalhados por Kirizawa (25). No que se refere aos aspectos histológicos, Ritto (23) e Ritto e Kato (41) fornecem descrição da raiz e do caule visando contribuir para estudos de autenticidade da droga comercializada para uso medicinal. Adicionalmente, Ritto (23) também indica os aspectos morfológicos de todas as partes da planta.

Conforme Kirisawa (25) e Ritto (23), a *C. regium* possui:

- Folha palminérvea, alterna, longo-peciolada com 3 - 5 lobos, subdigitada. Os lobos são acuminados ou agudos, a margem foliar é coriácea e a superfície pubescente;
- Flor amarela vistosa, com até 6 cm de diâmetro, disposta em panículas e localizada na extremidade de brotos grossos que contém de 5 - 6 flores (Figura 2). Possui cálice irregular e formado por 5 sépalas sendo 2 exteriores e lanceoladas e 3 interiores maiores e largas. Cada flor possui 5 pétalas, obovadas, com linhas coccíneas sobre fundo amarelo intenso. O androceu é polistêmone e o gineceu é formado por três carpelos de forma globosa encimado com estilete longo terminado com estigma captado;
- Fruto capsular ovóide loculicida, com 3 -5 valvas coriáceas inicialmente verde-escuros tornando-se acastanhados após maturação (Figura 3).
- Semente numerosa com 6 - 7 mm de comprimento, recoberta por pêlos longos, dura e impermeável à água, exigindo tratamentos específicos para superar a dormência (Figura 4);
- Raiz axial profunda e carnosa, atingindo cerca de 3 m de comprimento e 20 cm de diâmetro podendo ocorrer a presença de xilopódio (Figura 5).
- Caule ferrugíneo e nodoso.



Figura 1 – Partes aéreas de *C. regium* em habitat natural (mata nativa do *Campus* III, Universidade Anhanguera-Uniderp).



Figura 2 – Partes aéreas de *C. regium* em período de floração (mata nativa do *Campus* III, Universidade Anhanguera-Uniderp).

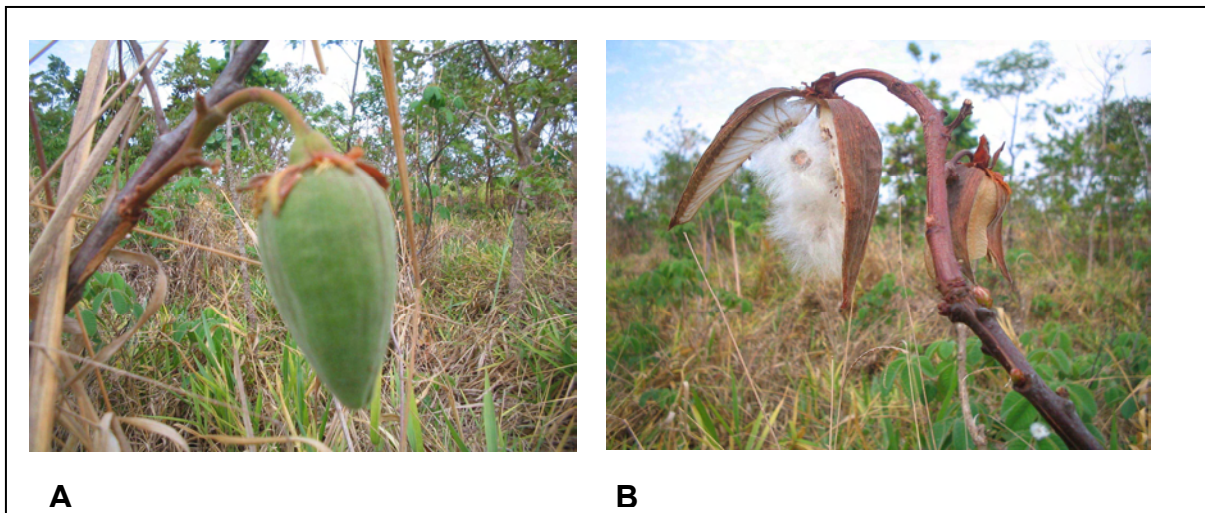


Figura 3– Ramos frutificados de *C. regium*. A) Fruto capsular fechado; B) Fruto capsular aberto permitindo a visualização da semente pilosa.

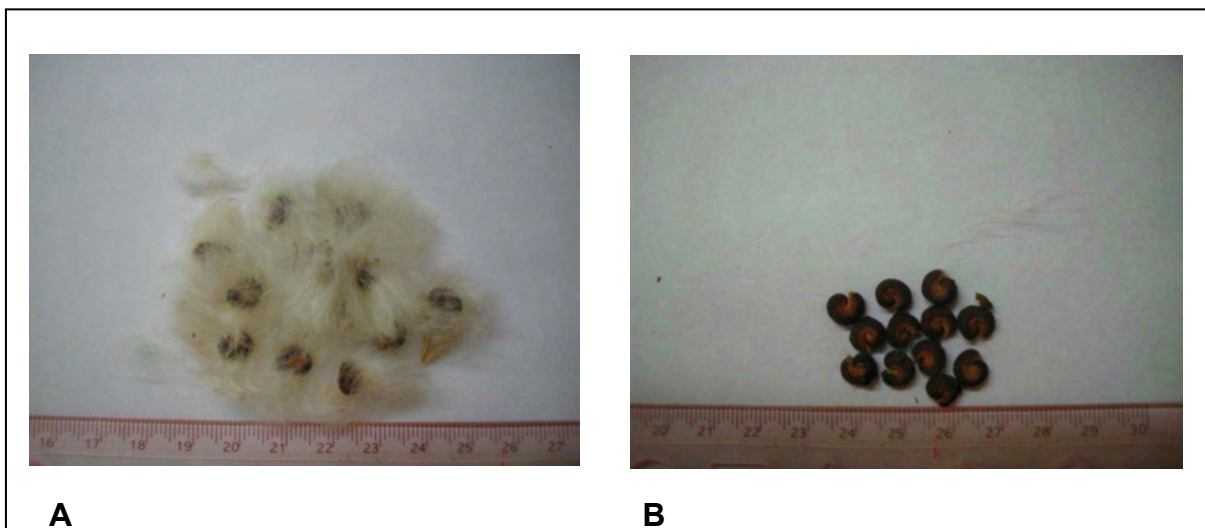


Figura 4 – Sementes de *C. regium*. A) Sementes com pêlo, B) Sementes sem pêlo.



Figura 5 – Coleta da raiz de *C. regium* do seu habitat natural (mata nativa do *Campus* III, Universidade Anhanguera-Uniderp).

A análise histológica descrita por Ritto (23) e Ritto e Kato (41) indicou que a raiz de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro possui cerca de 25 camadas celulares e região cortical pouco desenvolvida, contendo bolsas taníferas. O floema possui formato ogival com células de parede celular delgada e grão de amido, enquanto o xilema apresenta-se mais desenvolvido e rico em parênquima. A região central possui mais lignificação e parênquima menos abundante (Figura 6).

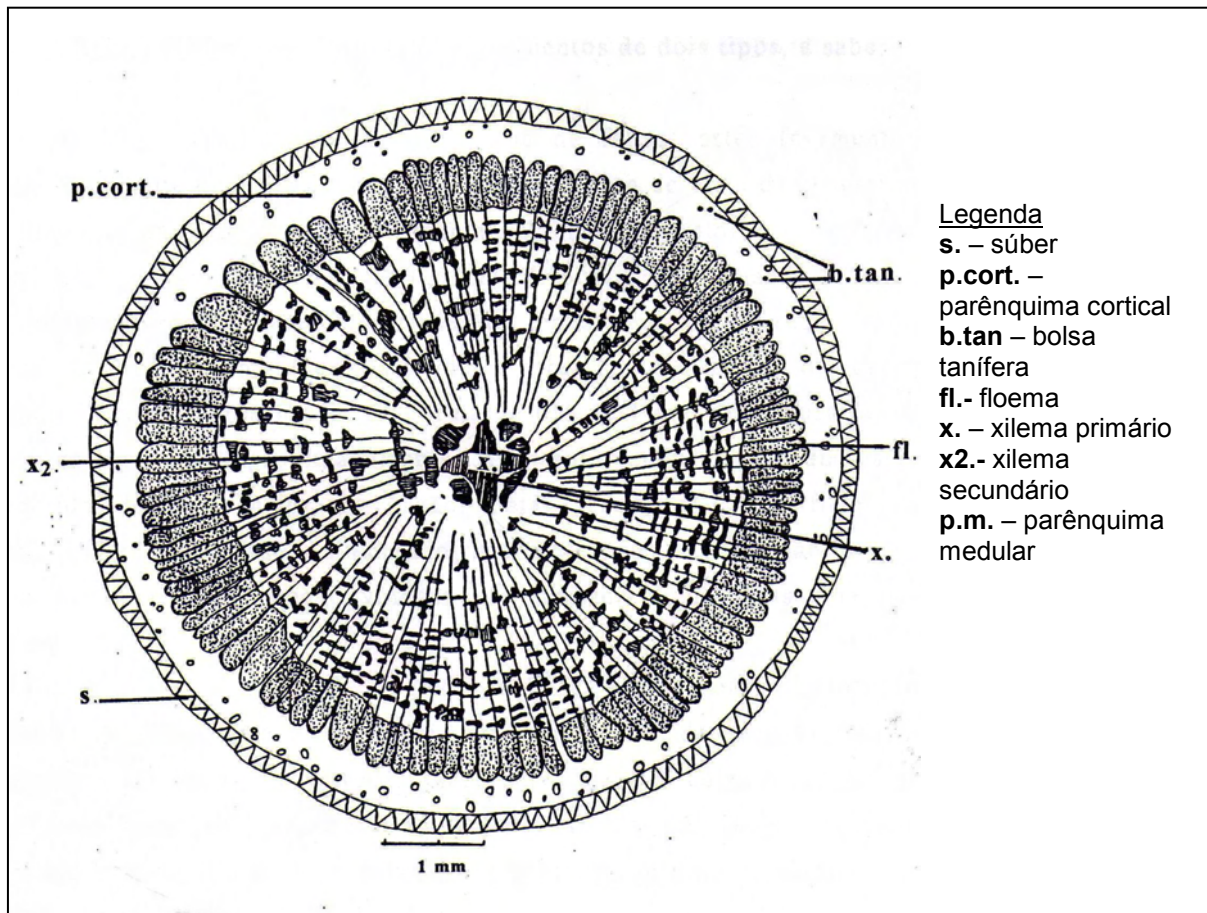


Figura 6 – Ilustração da secção transversal da raiz de *C. regium* com estrutura secundária estabelecida. Fonte: Ritto (23) e Ritto e Kato (41).

O caule em estágio mais avançado de desenvolvimento possui semelhança estrutural com a raiz em crescimento secundário. Há súber na periferia, floema com grupos de células esclerosadas alternando-se com células de paredes celulósicas e xilema secundário mais desenvolvido (Figura 7) (23, 41).

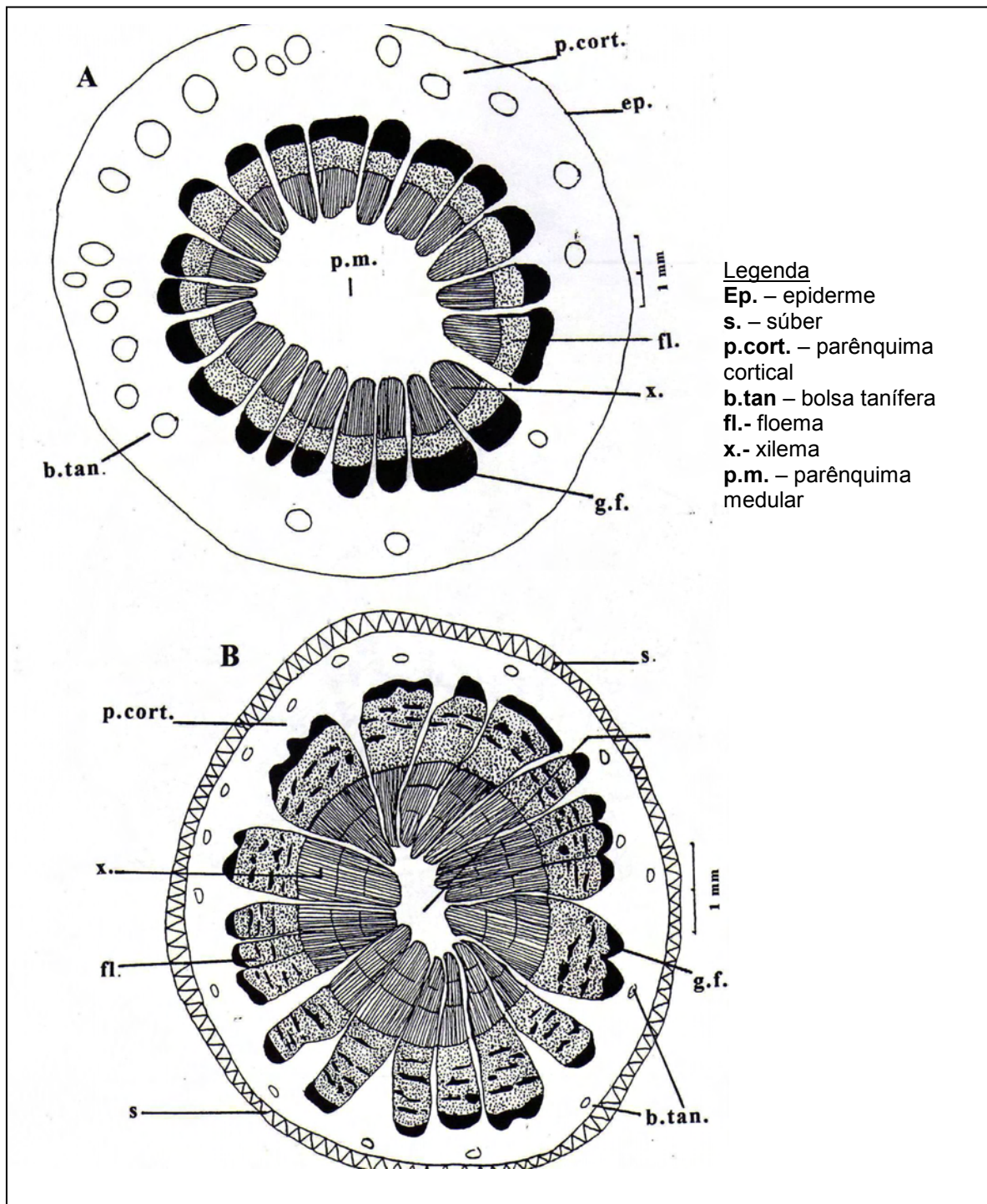


Figura 7 – Ilustração da secção transversal do caule de *C. regium*. A – Estrutura primária; B – Estrutura secundária. Fonte: Ritto (23) e Ritto e Kato (41).

2.3 ESTUDOS ETNOFARMACOLOGICOS DE *C. regium*

Dados etnofarmacológicos registram o uso medicinal do órgão subterrâneo de *C. regium* nas regiões do cerrado do Brasil, onde é popularmente conhecido como algodão-do-campo, algodãozinho-do-cerrado, algodãozinho, algodãozinho-do-campo, algodão-cravo, algodão-do-mato, algodoeiro-do-campo, butuá-de-corvo, pacotê e periquiteira-do-campo (Quadro 1) (19, 20, 22, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47).

O emprego medicinal do órgão subterrâneo destina-se ao tratamento de diferentes enfermidades relacionadas com a inflamação e infecção, geralmente, envolvendo alterações urogenitais (leucorréia, gonorréia). É indicado o uso tópico do decocto em forma de banho de assento ou a ingestão do enóleo (garrafada com vinho branco), decocto ou infuso aquoso (Quadro 1) (19, 20, 41, 44, 45, 46, 47).

A coleta do órgão subterrâneo é extrativista e o processamento para comercialização da droga é realizado de forma a serem obtidos fragmentos em forma de fatias, cavacos regulares ou flabeliformes, embaladas em sacos plásticos (Figuras 8 e 9) (23, 34, 35, 36, 37, 38, 41). O produto assim obtido é comercializado informalmente por raizeiros em feiras-livres, mercados municipais e ruas (41, 19, 20).

Segundo Ritto e Kato (41), o órgão subterrâneo destinado à comercialização é constituído em sua maior parte pela raiz com reduzida região caulinar (hipocótilo) e região do coleto.

Quadro 1 – Informações etnofarmacológicas sobre *C. regium* em comunidades dos Estados de Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS) e Goiás (GO)

Comunidade	Nome vulgar	Parte	Forma	Uso	Referência
Comunidade de Baús, Barra do Bugre, MT	Algodão do campo	raiz	Chá ou banho	Inflamação de mulher, inflamação do útero	45
Raizeiros, Cuiabá, MT	Algodão do campo	raiz	--	Gonorréia, inflamação do útero e ovário, leucorréia, afecções não específica do trato urinário	43
Comunidade Garimperia, Alto Coité-Poxoréo, MT	Algodãozinho do campo	raiz	Chá ou garrafada com vinho	Dor de bexiga e urina, depurativo, anti-acne	44
Raizeiros, Campo Grande, MS	Algodãozinho	Órgão subterrâneo	--	Colesterol, depurativo do sangue, inflamação do útero e ovário, inflamação qualquer, antiinflamatório, inflamação da pele, infecções uterinas, infecções da próstata, feridas internas e externas, laxante	19
Mossâmedes, GO	Algodãozinho	Casca, raiz	Decocto	Afecções urogenitais, purgativo	46
Pantanal, MT	Algodão-do-campo	casca	Chá	Depurativo do sangue	47



Figura 8 – Raiz de *C. regium* após coleta e retirada da casca conforme orientação para uso medicinal.

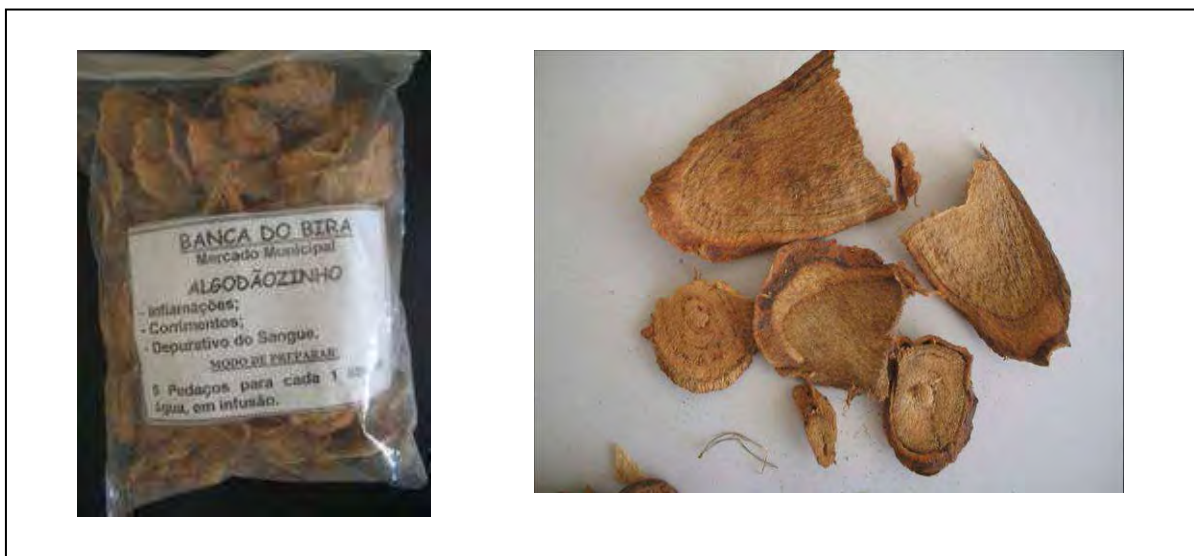


Figura 9 - Apresentação comercial de *C. regium* disponível no Mercado Municipal de Campo Grande/ MS. A) Produto embalado e rotulado; B) Conteúdo interno.

Com relação aos medicamentos formulados com produtos extrativos de *C. regium*, a literatura registra duas fórmulas de complexos homeopáticos (Laboratório Farmacêutico Francês *Plantes et Medicines*) e uma de fitoterápico (Extrato composto Magaraz, Laboratório Farmacêutico Brasileiro) (48, 49, 50).

Os medicamentos homeopáticos formulados com *C. regium* pelo laboratório francês *Plantes et Medicines* são conhecidos como “Poconéol n° 16” (*Meibomia triflora* 5 CH, *Cochlospermum insigne* 5 CH, *Leonorus glubusus* 5 CH, *Mikania guaco* 5 CH) e “Poconéol n° 54” (*Anethum foeniculum* 5 CH, *Cochlospermum insigne* 5 CH, *Ruta graveolens* 5 CH) indicados, respectivamente, para o tratamento de afecções bronco-pulmonares e ginecológicas. Considerando que a matéria-médica homeopática de *C. regium* inexistente, a incorporação deste vegetal nas fórmulas homeopáticas organicistas pode estar ocorrendo pelo uso homeopático relacionado à indicação medicinal da fitoterapia e não como cura pela similitude (51, 52).

O “Extrato Composto Magaraz” (*Cinchona calisaya*, *Costus spicatus*, *Cochlospermum insigne* e *Croton campestris*), indicado para o tratamento de úlcera, gastrite, má digestão e infecção urinária e comercializado no Brasil em meados do ano 2000, teve o seu registro indeferido como “Fitoterápico Novo” frente ao Ministério da Saúde por estar em desacordo com a legislação brasileira (48). Posteriormente, a Resolução n° 1.175 (08/07/2002) determinou a apreensão em

todo território nacional, deste e outros fitoterápicos produzidos pela empresa “Indústria e Comércio de Produtos Naturais Magaraz Ltda.” (Araguari/ MG), por estarem sendo comercializados antes da obtenção dos registros na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (49).

2.4 INFORMAÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADAS AO USO MEDICINAL DE *C. regium*

Após Siqueira *et al.* (19, 53) observarem que *C. regium* está incluída entre as plantas medicinais de maior comercialização pelos raizeiros de Campo Grande/ MS, tanto no que se refere a indicação pelo raizeiro quanto a procura espontânea pelo consumidor, houve impulso para diferentes estudos científicos que objetivaram, fundamentalmente, subsidiar o conhecimento popular sobre o uso medicinal da droga. Até o momento, os dados científicos disponíveis indicam o perfil químico e farmacognóstico e respaldam, pelo menos em parte, a sua segurança e eficácia.

2.4.1 Investigações biológicas e químicas

O efeito antibacteriano da raiz de *C. regium* foi analisado sobrecepas selvagens de *S. aureus* e *E.coli* obtidas de pacientes do Hospital Universitário-UFMS (isoladas no Laboratório de Microbiologia-UFMS) no teste de difusão em disco onde os extratos hidroetanólico e acetato de etila promoveram inibições semelhantes aos antibióticos padrão (vancomicina e cefoxitina). Com intuito de verificar este efeito em preparações populares de uso empírico, os autores observaram que os decoctos (12, 24 e 60 g/L) não foram ativos (54).

Ao realizarem triagem de plantas do nordeste do Brasil com potencial antitumoral, Moraes *et al.* (55) verificaram inibição do carcinosarcoma de Walker (256) somente em 2% das células tumorais tratadas com extrato aquoso da raiz de *C. regium*.

Ritto *et al.* (56) realizaram a avaliação farmacológica do extrato fluido liofilizado em camundongos adultos fêmeas verificando efeito depressor do Sistema Nervoso Central através do *screening hipocrático*, ausência de efeito anti edematogênico sobre o edema auricular induzido por óleo de cróton 5% e atividade antiulcerogênica moderada observada em modelo induzido por indometacina nas doses de 200 e 300 mg/kg (v.o.), inibindo as lesões em 37 e 43%. O mesmo extrato foi testado em ensaio toxicológico agudo resultando em DL₅₀ de 401±9,7 mg/kg e 5 g/kg quando administrado via intraperitoneal (v. ip.) e via oral (v.o.), respectivamente (23, 56). De acordo com a classificação de Oga (57) sobre o grau de toxicidade aguda de substâncias administradas por via oral, o resultado registrado por Ritto *et al.* (56) de 5 g/kg indicam que *C. regium* possui mais do que o dobro do valor da concentração máxima para categoria de substâncias nocivas (0,2 - 2 g/kg) indicando, portanto, que a droga possui baixa capacidade tóxica por via oral, em dose aguda.

Os ensaios *in vivo* realizados por Toledo (58) e Toledo *et al.* (59) são semelhantes aos resultados de Ritto *et al.* (56) sobre a toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico administrado v.o. e v.ip.. A DL₅₀ v.ip. foi obtida entre 147,91 e 175 mg/kg dependendo do tipo e do sexo do animal submetido ao tratamento (ratos, camundongos, machos ou fêmeas) e, a DL₅₀ v.o. resultou em valores de 3,0 g/kg em ratos e 3,37 g/kg em camundongos. Em experimento sub-agudo, Toledo *et al.* (59) afirmaram haver tolerância do extrato hidroalcoólico após tratamento de ratos (v.o.) e camundongos (v.o. e v.ip.), nas doses de 200, 400 e 800 mg/kg, visto ocorrer diarreia e alterações motoras somente nos cinco primeiros dias de tratamento. Esses autores concluíram que, o extrato hidroalcoólico da raiz de *C. regium* provoca baixa toxicidade quando administrado oralmente em ratos, tanto em experimento agudo como sub-agudo. Também atribuíram moderada toxicidade ao extrato em administração intraperitoneal em ratos e camundongos, cujos sintomas principais foram hemorragia intestinal e peritonite.

Ensaio *in vitro* registram que o extrato aquoso liofilizado não ocasionou ação mutagênica em células germinativas de *Drosophila melanogaster* quando testado nas doses de 13, 19 e 25 mg/mL (60, 61), porém, provocaram mutação e recombinação em células somáticas (60). Ao ser avaliado sobre células ovarianas (CHO-K1) de hamster chinês, o extrato aquoso diminuiu significativamente a proliferação celular induzindo a apoptose em 50 % das células viáveis (EC₅₀) na

concentração de 1,5 mg/mL, sugerindo efeito citotóxico em soluções muito concentradas (62).

A observação de micronúcleos formados em células de medula óssea e de sangue periférico de camundongos indicou genotoxicidade importante para os extratos polares administrados v.ip. em doses acima de 38 mg/kg (63, 64, 65). Segundo Cabral *et al.* (64), os animais tratados com 60 e 120 mg/kg resultaram na frequência de micronúcleos maior do que o observado nos animais tratados com ciclofosfamida, um agente quimioterápico indutor de genotoxicidade.

No que se refere aos estudos toxicológicos acima citados, tanto realizados *in vivo* como *in vitro*, é importante comentar que o uso popular de *C. regium* como droga medicinal deve ser cauteloso até haver maior subsídio científico que estabeleça a relação do risco *versus* benefício. Este aspecto também reforça a necessidade de haver estudos tecnológicos associados aos biológicos e químicos na busca de extratos secos com menor teor de substâncias indesejáveis e enriquecidos com substâncias ativas.

Com relação à composição química, os ensaios fitoquímicos tradicionais realizados por via úmida descrevem que a raiz de *C. regium* possui taninos e outros compostos fenólicos, mucilagens, saponinas, esteróides, triterpenos e flavonóides (23, 25). A presença desta última classe é corroborada por Siqueira *et al.* (66), De Lima *et al.* (67) e Ritto (23) ao registrarem o isolamento do kaempferol [2], naringenina [3], aromadendrina [4] e diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo [1] (Figura 10). Ritto (23) também mencionou o isolamento da 1-hidroxitetradecan-3-ona [5] (Figura 10).

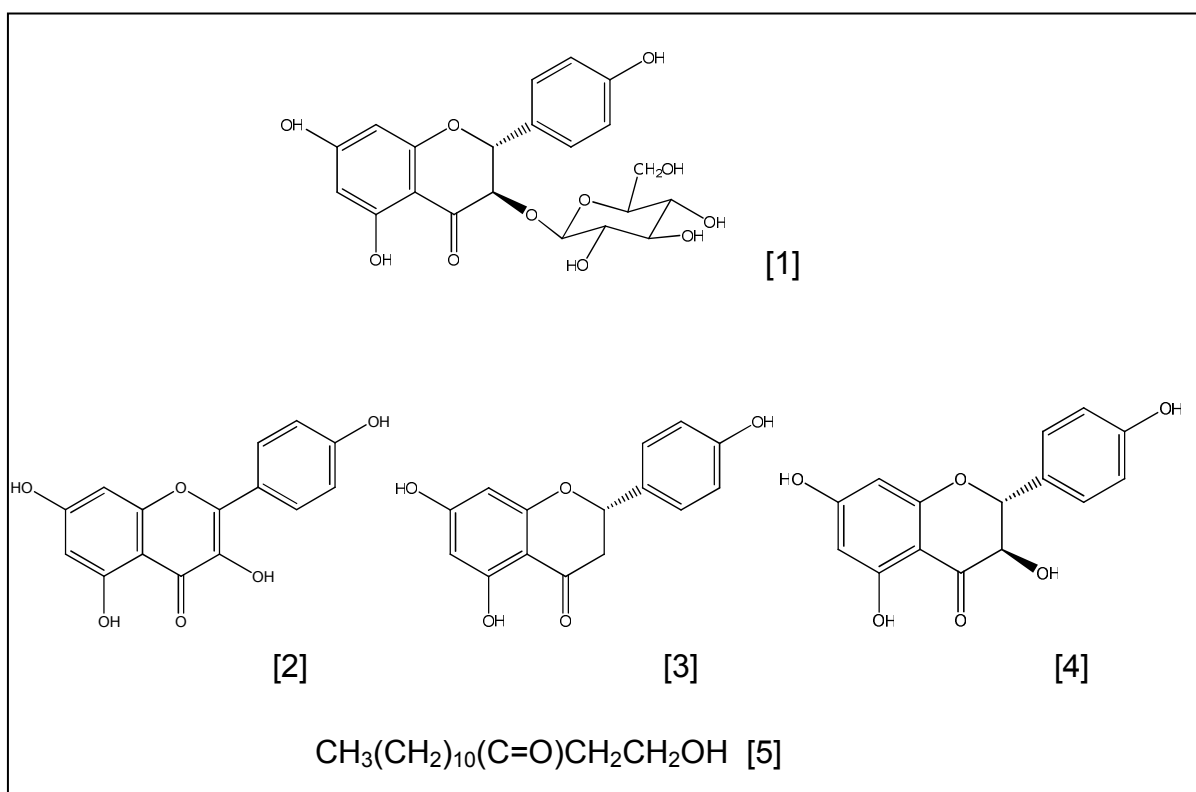


Figura 10 – Metabólitos secundários isolados da raiz de *C. regium*: diidrokaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo [1], kaempferol [2], naringenina [3], aromadendrina [4] e 1-hidroxitetradecan-3-ona [5]. Fonte: Ritto (23), Siqueira *et al.* (66) e De Lima *et al.* (67).

Estudos farmacológicos realizados com o diidrokaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo isolado da raiz de *C. regium* indicaram que esta substância não possui atividade antiedematogênica sobre o edema induzido por carragenina e atividade antimicrobiana sobre cepas selvagens de *S. aureus* e *E. coli*, sendo efetivo como analgésico sobre a contorção abdominal provocada por ácido acético (54, 68, 69). A pesquisa detalhada do mecanismo antinoceptivo deste flavonóide, realizada por Castro (69), descreveu que essa ação deve ocorrer de forma diferente dos caminhos fisiológicos tradicionais mostrando-se útil para o desenvolvimento de drogas analgésicas com um novo perfil de atuação.

Apesar de Ritto (23) ter afirmado ausência de óleo essencial na raiz de *C. regium*, sua presença e quantificação foram determinadas por Brum *et al.* (70) indicando haver 0,25% de essência capaz de inibir *S. aureus* (MIC 1,5 mg/mL) e *S. typhimurium* (MIC 5,0 mg/mL). A análise deste óleo por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa permitiu que estes autores identificassem os terpenos β-selineno (34,1%), elemeno (5,4%), trans-cariofileno (4,8%), α-pineno

(3,4%), α humuleno (2,8%), aromadendrina [3] (2,1%), α -selineno (1,2%), δ -cadineno (0,8%) e outras substâncias não determinadas (45,4%) (70). A presença de óleo essencial em *C. regium* também é registrada nas folhas por Rouquayrol *et al.* (42) que, ao analisarem o hidrolato sobre ensaio moluscicida, observaram ausência deste efeito.

O potencial antioxidante de *C. regium* é citado por Fratin *et al.* (71) ao desenvolverem o fracionamento biomonitorado da raiz sobre a capacidade de descoloração do radical difenil-picril-hidrazila (DPPH) por método espectrofotométrico. Revelaram que a partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico com gradiente de polaridade enriquece as substâncias ativas na fração acetato de etila.

2.4.2 Investigações farmacognósticas

Sobre os aspectos relacionados à análise farmacognóstica, já foram propostos por Ritto (23) e Ritto e Kato (41) a descrição morfo-anatômica e alguns parâmetros físico-químicos da droga (umidade: 15,15%, cinzas totais: 2,58%) e do extrato-fluído preparado por percolação pelo *Processo A*, conforme descrição da Farmacopéia Brasileira II (72) (teor alcoólico: 25,2%, pH: 5,3, resíduo seco: 12,73%, cinzas totais: 2,08%).

A análise morfo-anatômica da raiz descreveu súber bem desenvolvido com células suberosas de contorno retangular alongadas no sentido tangencial, presença de bolsas taníferas na região cortical, drusas e grãos de amido, alternância de fibras e de tecidos moles na região floemática, xilema com vasos isolados ou em pequenos grupos envolvidos por parênquima paratraqueal (23, 41). Para diagnose do pó, os autores afirmaram ser necessário visualizar drusas e grãos e amido, bolsas taníferas, vasos pontuados e súber com células de contorno poligonal quando visto de face e retangular e alongados quando vistos em corte transversal ou longitudinal radial, conforme consta na Figura 11 (23, 41). Indicaram também que a droga possui sabor amargo e adstringente.

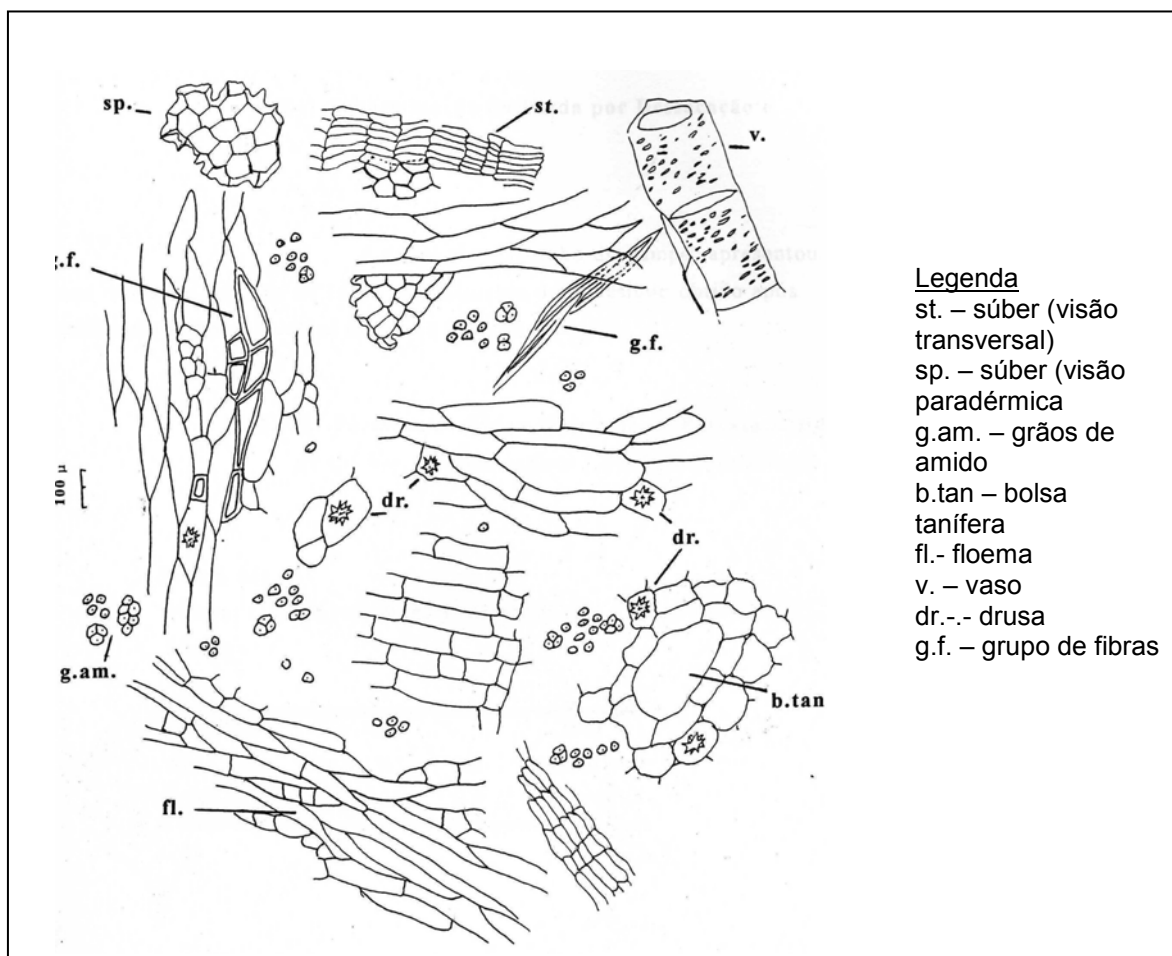


Figura 11 – Ilustração dos elementos histológicos da raiz de *C. regium* que devem ser encontrados na diagnose da droga pulverizada. Fonte: Ritto (23) e Ritto e Kato (41).

Os aspectos farmacognósticos de autenticidade e integridade (contaminação por fungos e elementos estranhos) de amostras fornecidas por raizeiros da região central do município de Campo Grande/ MS, nos anos de 1992 e 2002, foram avaliados por Nunes *et al.* (19). Estes autores constataram teor de sujidades acima do permitido e presença de fungos em todas as amostras de *C. regium* obtidas no ano de 2002, demonstrando que o produto fornecido pelo raizeiro não possuía os requisitos mínimos de qualidade para comercialização de drogas medicinais destinadas ao uso de chás.

Técnicas eletroanalíticas de voltametria cíclica e do pulso diferencial foram utilizadas por Oliveira *et al.* (73) para estudo de quatro amostras da raiz de *C. regium*. As amostras resultaram potenciais anódicos de 0,17, 0,25, 0,26 e 0,29 V e perfis dos voltamogramas úteis para identificação da droga. Os autores propuseram

estas técnicas como ferramenta analítica para o controle da qualidade e para observação da ação antioxidante de drogas vegetais.

2.5 INTERESSE MEDICINAL E ESTUDOS CIENTÍFICOS SOBRE OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Cochlospermum*

Dados etnofarmacológicos reportam o uso empírico de *C. tinctorium* (África), *C. vitifolium* (África e Américas do Sul e Central), *C. angolense* (África) e *C. planchonii* (África) para tratar problemas hepáticos e como antiparasitários, especificamente, indicadas para icterícia, malária e esquistossomose.

O conhecimento químico e biológico da raiz de ***C. tinctorium*** mostra-se mais amplo na literatura, onde há registro sobre o isolamento de ácido arjunólico [6], ácido alfitólico [7], ácido 3-O-E-*p*-cumaroilalfitólico [8], miricetina [9], quercetina [10], kaempferol [2], cianidina [11], 5,4'-dimetilquercetina [12], 7,3'-dimetildiidroquercetina [13], cochloxantina [14], diidrocochloxantina [15], ácido gálico [16], ácido elágico [17], 1-hidroxihexadecan-3-ona [18], elagiotaninos e diferentes açúcares (74-80) (Figura 12). Análises quantitativas determinaram o teor de polissacarídeos em 59,3% e de polifenóis em 9,3% (79, 80).

O emprego medicinal desta droga está relacionado, principalmente, como hepatoprotetor existindo em preparações populares associada com outras espécies medicinais (81). As atividades antimicrobiana, hepatoprotetora, antiplasmódica, antioxidante, antiúlcera e imunomoduladora também foram reportadas (74-76, 78, 79, 81-87).

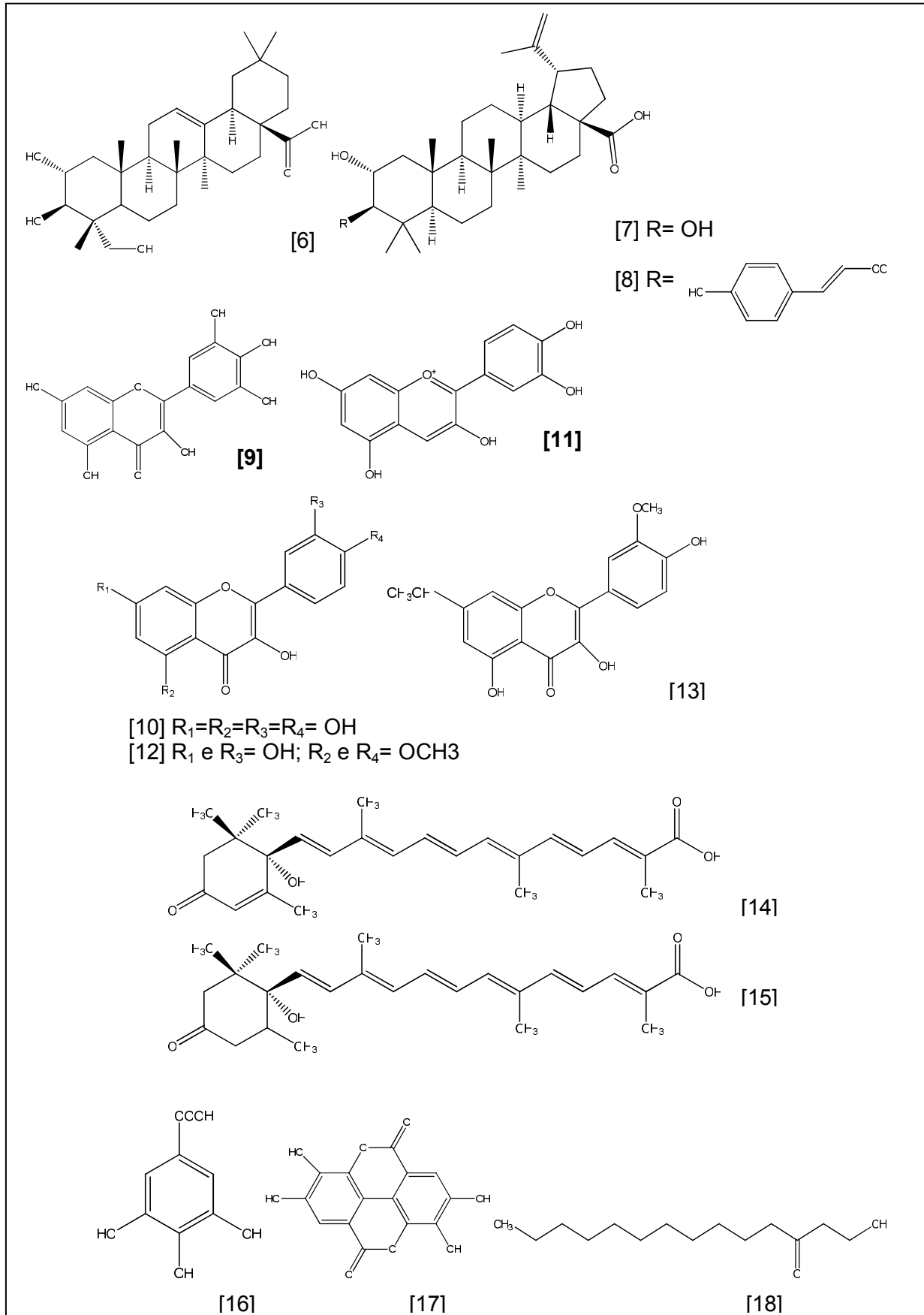


Figura 12 – Estruturas moleculares de alguns metabólitos secundários isolados de *C. tinctorium*. Fonte: Diallo *et al.* (74-77), Ballin *et al.* (78) e Nerdgard *et al.* (79, 80).

Os decoctos do caule e folha de *C. vitifolium* foram descritos para o tratamento de feridas, doenças hepáticas, malária, diabetes, hipertensão, entre outras doenças, em regiões da Costa Rica, Cuba, Panamá, Brasil, Guatemala, Bolívia, México e África do Sul (88-93). Ensaio biológicos mostraram ação positiva desta droga como antiinflamatória e no processo de Síndrome Metabólica sendo, portanto, benéfica como vasorelaxante, hipoglicêmica e hepatoprotetora (90, 91, 93). Extratos do caule e folha foram atóxicos via intraperitonal, com DL₅₀ superior a 2000 mg/kg (88).

O estudo químico de diferentes partes e extratos de *C. vitifolium*, realizado por Almeida *et al.* (92), levou a identificação de ácido gálico [16], esteróides sitosterol e estigmasterol livres e glicosilados (3-O-β-glicopiranosídeos), cetonas alifáticas de cadeia longa, ácidos graxos, triacilbenzeno 1-dodecanoil 3,5-di(tetradecanoil)benzeno conhecido como cochlospermina C [19], lignanas excelsina [20] e pinoresinol [21], flavonóides aromadendrina [4] e naringenina [3] (Figuras 12, 13). Esta última substância também foi relatada por Sanches-Salgado *et al.* (93) ao avaliarem o caule de *C. vitifolium* nativa do México.

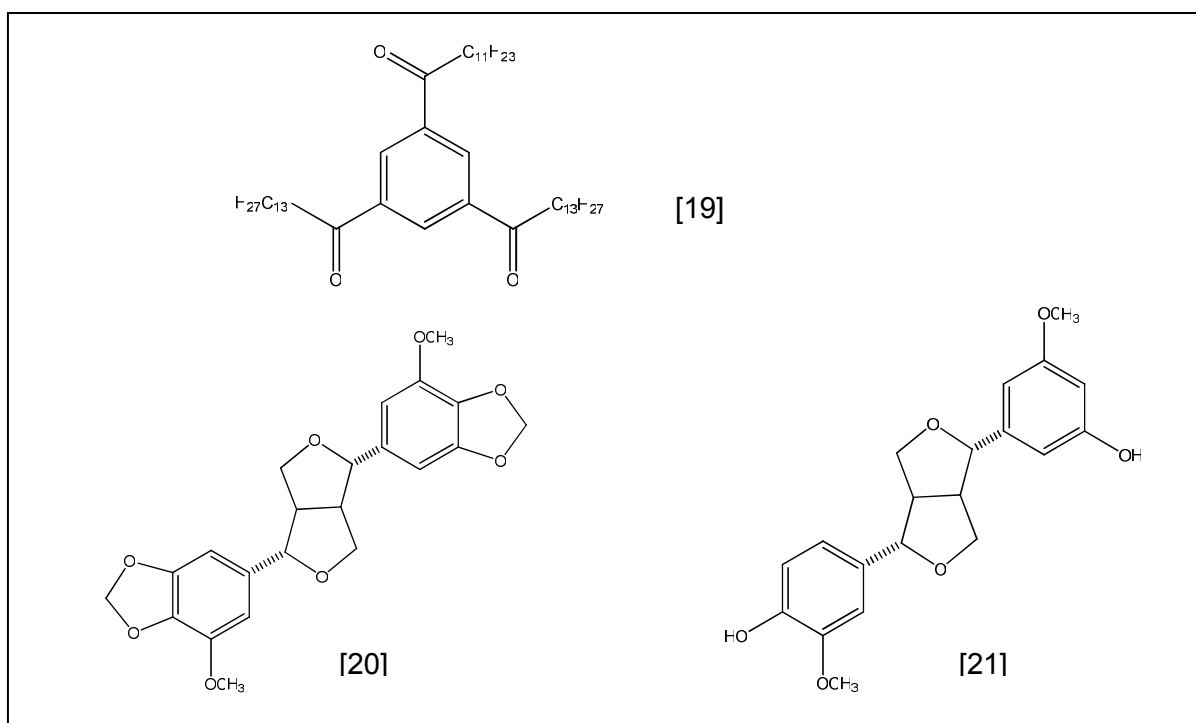


Figura 13 – Alguns metabólitos secundários isolados de *C. vitifolium*: cochlospermina C [19], excelsina [20], pinoresinol [21]. Fonte: Almeida *et al.* (92).

Almeida *et al.* (92) também citaram os metabólitos identificados nos óleos essenciais da folha e raiz (casca e lenha) de *C. vitifolium* por cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massa (CG/ MS), relacionando-os aos seus teores em percentagem (Tabela 1). Mediante a comparação do estudo fitoquímico de *C. vitifolium* com a composição de outras espécies deste gênero, esses autores sugeriram que o perfil químico deste táxon envolve a presença de sesquiterpenos, cetonas alifáticas de cadeia longa, flavonóides e triacilbenzenos.

Tabela 1 – Constituintes químicos voláteis identificados nos óleos essenciais da folha e raiz (casca e lenha) de *C. vitifolium*, através de CG/ MS

Constituintes	Folha*	Casca da raiz*	Lenho da raiz*
α -Pinoeno	4,8	-	-
β -Pinoeno	10,6	-	-
Mirceno	1,7	-	-
β -Felandreno	1,7	-	-
<i>E</i> - β - ocimeno	2,7	-	-
α -Terpineno	1,6	-	-
α -Copaeno	-	0,9	-
β -Cariofileno	46,5	8,2	11,6
α -Humuleno	26,0	1,3	1,9
<i>E</i> - β -Farneseno	-	3,7	2,7
γ -Muuroleeno	-	-	28,4
Germacreno	3,3	3,4	-
2-Dodecanona	-	1,2	6,3
2-Tridecanona	-	3,2	2,4
β -Bisaboleno	-	29,3	11,5
<i>Z</i> - γ -Bisaboleno	-	1,2	-
Cadineno	-	2,2	2,8
<i>E</i> - γ -Bisaboleno	-	2,1	0,8
Óxido de cariofileno	1,0	-	-
Tetradecanona	-	0,9	-
Epi- α -cadinol	-	0,9	0,9
Epi- α -muurolol	-	1,4	1,6
α -Muurolol	-	-	0,6
α -Cadinol	-	2,3	2,6
Epi- α -Bisabolol	-	3,2	-
1-hidroxi-3-tetradecanona	-	3,1	-
1-hidroxi-3-hexadecanona	-	19,5	16,2

*teor baseado na porcentagem normalizada. Fonte: Almeida *et al.* (92).

C. planchonii é conhecida como falso-algodão ou N'Dribala no oeste africano, onde a raiz é utilizada como agente antiparasitário e para tratar a icterícia (94-96). Os efeitos antiplasmódico e tripanossomicida foram comprovados por Benoit-Vical *et al.* (84, 95), Vonthron-Senecheau *et al.* (97) e Atawodi (98), sendo a ação hepatoprotetora afirmada por Aliyu *et al.* (94). A análise química do extrato

apolar da raiz de *C. planchonii* culminou no isolamento de triacilbenzenos determinados, em estudo posterior, como cochlosperminas A [22], B [23], C [19] e D [24] (Figura 14) (89).

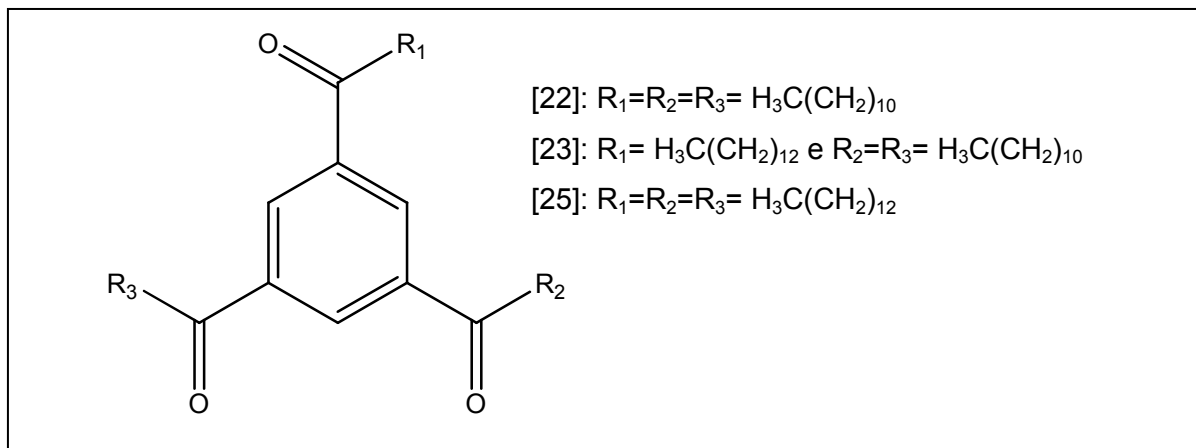


Figura 14 – Substâncias isoladas da raiz de *C. planchonii*: cochlospermina A [22], B [23] e D [24]. Fonte: Achenbach *et al.* (89).

Sobre *C. angolense* é apenas registrado o emprego do extrato aquoso da raiz na profilaxia da icterícia e malária, e comprovada ação antiparasitária e antiviral (99-101).

A investigação fitoquímica da casca de *C. gillivraei*, realizada por Cook e Knox (102), registrou a presença das geninas flavônicas naringenina [3], apigenina [26] e afzelequina [27] e os glicosídeos prunina [28], cosmosiina [29]. Estes autores citam que as folhas de *C. religiosum* possuem quercetina [10], kaempferol [2] e cianidina [11] (Figura 15).

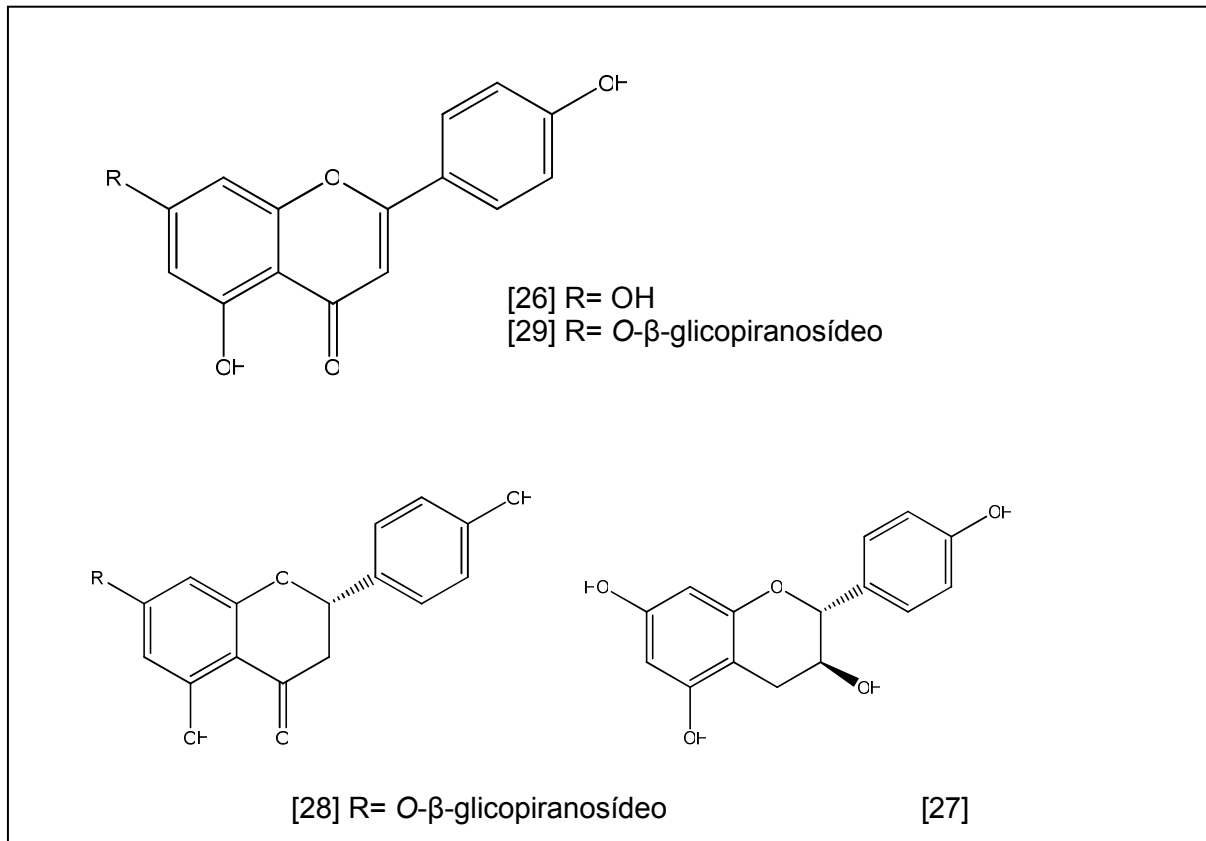


Figura 15 – Substâncias isoladas da raiz de *C. gillivraei*: apigenina [26] e afzelequina [27] e os glicosídeos prunina [28], cosmosiina [29]. Fonte: Cook e Knox (102).

Segundo Janaki e Sashidhar (103, 104), a *Food and Agriculture Organisation* (FAO) inclui as gomas extraídas do caule de *Cochlospermum* sp. como substitutas ou adulterantes da goma Caraia (*Sterculia* sp.), priorizando os exsudatos obtidos de ***C. gossypium*** (goma Kondagogu) e *C. religiosum* (goma katira) que, mesmo possuindo diferenças químicas e físico-químicas, substituem comumente a goma Caraia. Pesquisas determinaram as propriedades físico-químicas, químicas e a toxicidade sub-crônica da goma Kondagogu garantindo seu potencial como aditivo alimentar (103-106).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo fitoquímico e farmacognóstico da raiz de *C. regium* visando adquirir informações auxiliares para sua padronização como matéria-prima vegetal para produção de fitoterápicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico da raiz de *C. regium* através de métodos cromatográficos clássicos de isolamento e espectrométricos de identificação monitorando, quando possível, o fracionamento químico com o ensaio biológico antimicrobiano;
- Definir os parâmetros farmacognósticos para: caracterização botânica e organoléptica, distribuição granulométrica, densidade aparente, densidade por compactação, umidade da raiz fresca, umidade da droga, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, *fingerprint* e quantificação dos marcadores químicos isolados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FRACIONAMENTO QUÍMICO E ENSAIO ANTIMICROBIANO

4.1.1 Material botânico

A raiz foi coletada no cerrado nativo do *Campus* III da Universidade Anhanguera-Uniderp, Município de Campo Grande/MS (latitude 20°26'14'' longitude 54°32'14''), em agosto de 2006. A exsicata foi identificada pela Prof^a Ubirazilda Maria Resende e depositada no Herbário CG/MS, Campo Grande (MS), sob registro nº 23466.

O processamento da droga envolveu limpeza em água corrente, retirada da casca, corte manual (< 1 cm, Figura 16), secagem em estufa com ventilação de ar (40°C) e pulverização em micromoinho elétrico (Tecnal 648). As amostras foram armazenadas em recipiente fechado de vidro âmbar, ao abrigo da luz e do calor.



Figura 16 – Raiz de *C. regium* após coleta, limpeza, retirada da casca e corte manual.

4.1.2 Fracionamento químico

4.1.2.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico, frações e substância 1

A raiz em pó (300 g) foi extraída sucessivamente com solução hidroalcoólica 70%, por maceração, até esgotamento. O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo até consistência de xarope e submetido à partição com hexano (Hex), clorofórmio (CHCl_3), acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH). As fases orgânicas foram evaporadas até eliminação completa do solvente extrator e a solução hidroetanólica restante foi mantida em baixa temperatura (8 °C), onde houve cristalização espontânea de ácido elágico (**1**; 500 mg).

A determinação do resíduo sólido do extrato hidroetanólico e das frações orgânicas foram realizadas por gravimetria após secagem em estufa (extrato hidroetanólico: 105°C, frações: 40 °C) e os rendimentos das frações e substâncias isoladas foram determinados em percentagem a partir da raiz seca e do extrato hidroalcoólico.

4.1.2.2 Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila

Mediante o rendimento, resultado do ensaio antimicrobiano (4.1.4) e perfil químico obtido por cromatografia em camada delgada (CCD), foi realizado o fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila visando o isolamento de metabólitos secundários (Figuras 17 e 18).

Neste sentido, a fração AcOEt (2 g) foi cromatografada em coluna aberta (100 x 5 cm) empregando sílica gel 60 eluída com gradiente de CHCl_3 :MeOH (95:05, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 50:50, 25:75). Neste fracionamento, a fração AcOEt forneceu 132 frações de 30 mL, dentre as quais foram identificadas a aromadendrina (**2**; fração 40; 4 mg) e o ácido gálico (**3**; fração 98; 17 mg).

Visando a obtenção de maior rendimento das frações cromatografadas, nova alíquota da fração AcOEt (10 g) foi fracionada nas mesmas condições experimentais

resultando em 110 frações de 30 mL de onde foram isolados o galato de etila (**4**; fração 16-18, 15 mg) e o diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo (**5**; fração 29, 23 mg). A subfração 35-41 (1,0 g) foi refractionada em coluna de permeação em gel (Sephadex LH-20, 40 x 3,5 cm) sob eluição com metanol (MeOH) fornecendo 95 frações de 10 mL. As subfrações 25-30 (100 mg) obtidas deste último fracionamento foram reunidas e refractionadas em coluna de permeação em gel em condição semelhante ao experimento anterior fornecendo 50 frações de 10 mL, de onde foi identificada o diidrokaempferol-3-O- β -(6''galoil)-glicopiranosídeo (**6**; fração 28-32; 5 mg).

4.1.2.3 Obtenção das substâncias **7** e **8**

A raiz em pó (10 g, coleta 2) foi extraída com 100 mL de EtOH:H₂O (9:1), sob maceração durante 3 dias. O filtrado foi armazenado em baixa temperatura (5-10 °C) e, aproximadamente após 15 dias, forneceu precipitado cristalino abundante (50 mg) que se caracterizou por ser uma mistura dos triacilbenzenos cochlospermina A (**7**) e B (**8**).

A preparação deste macerado atendeu uma pesquisa paralela que objetivou verificar a atividade antimicrobiana de tinturas preparadas com a raiz de *C. regium* extraídas, sob maceração, com soluções hidroalcoólicas de diferentes graduações (30, 50, 70 e 90 °GL) (107). O aparecimento de cristal espontâneo na tintura extraída com álcool 90 °GL (após resfriamento) foi inesperado e sua elucidação molecular foi incorporada nesta pesquisa.

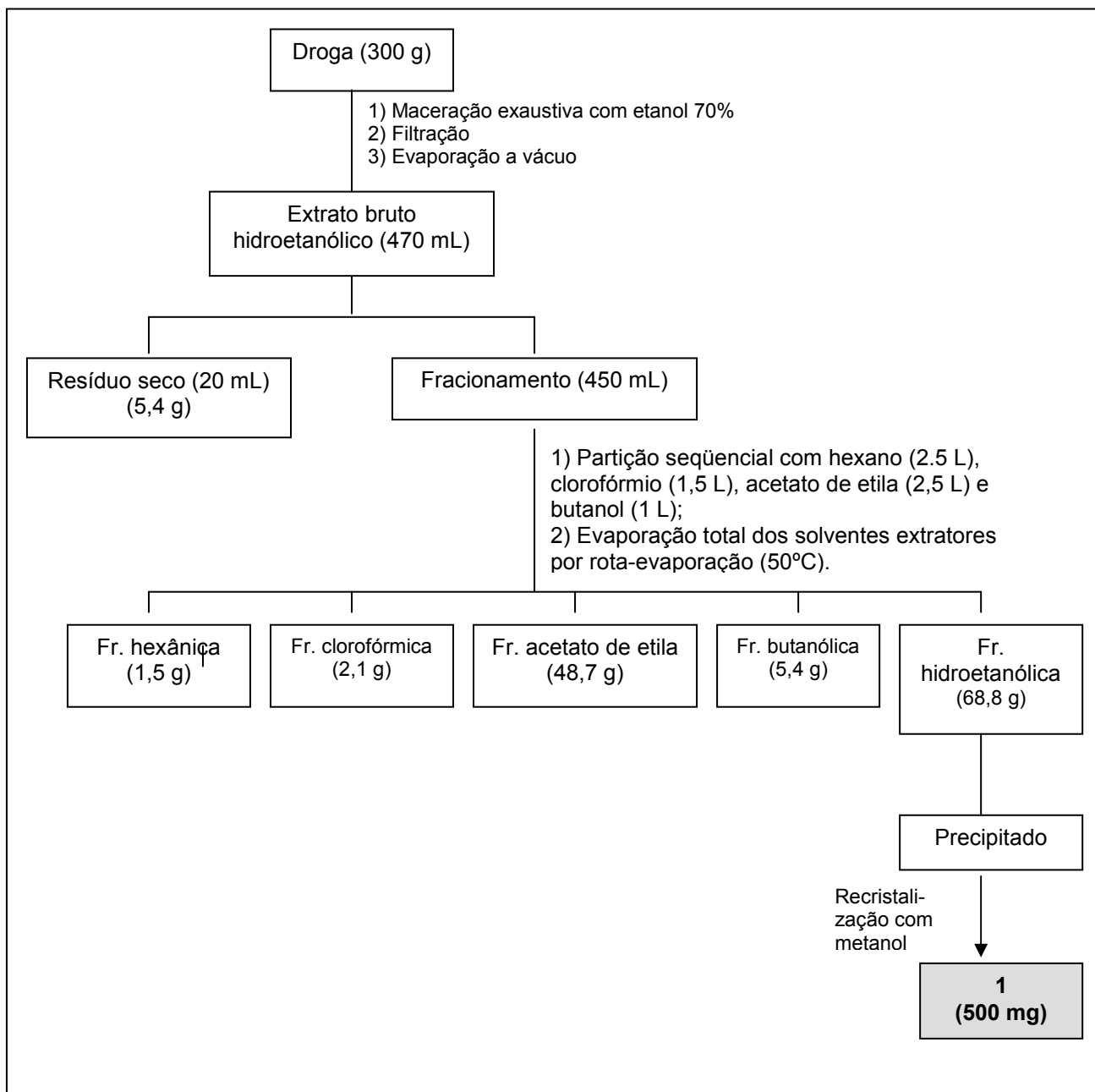


Figura 17 - Fracionamento do extrato bruto hidroetanólico da raiz de *C. regium* resultando no isolamento da substância 1.

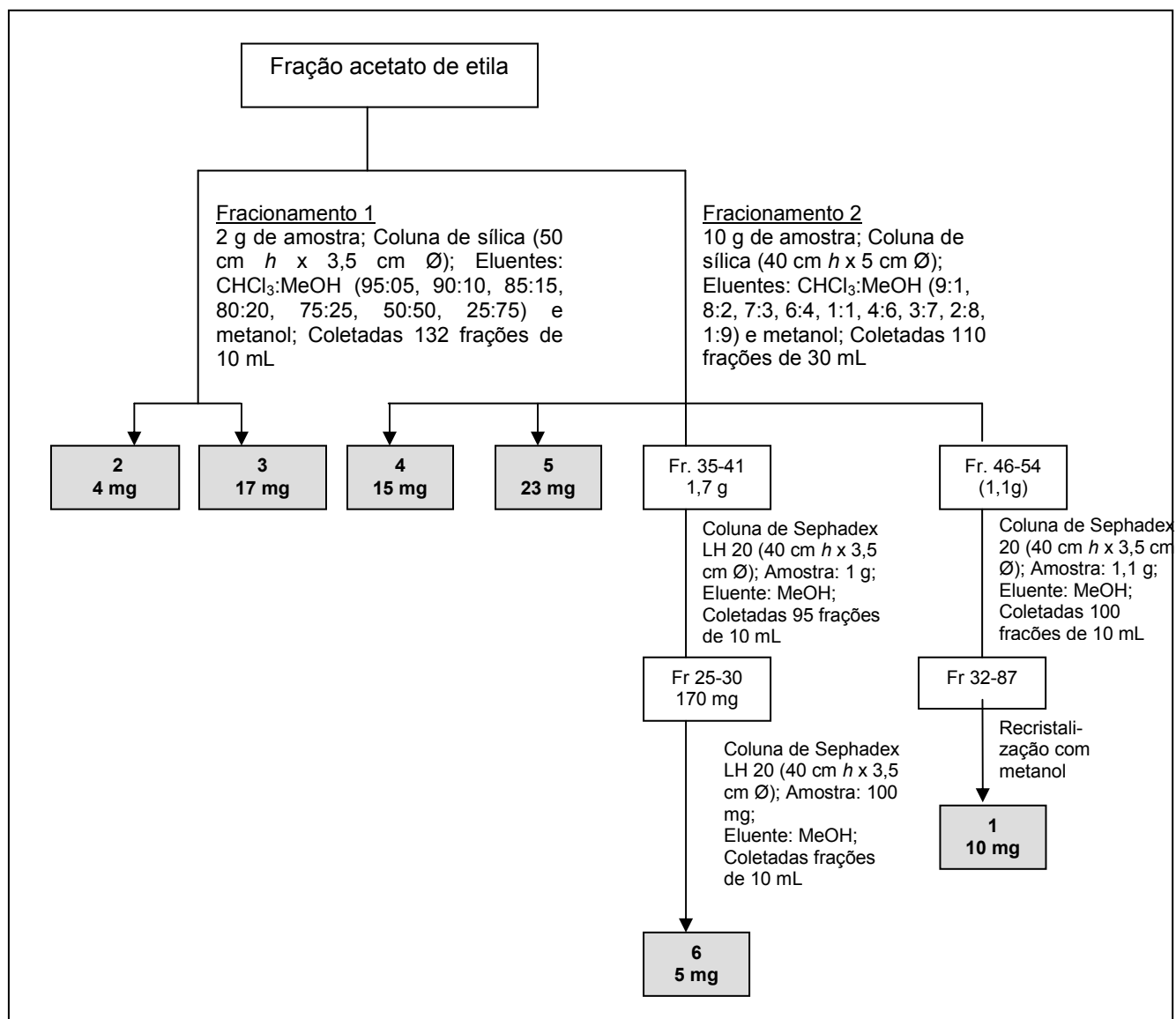


Figura 18 – Separação cromatográfica da fração acetato de etila da raiz de *C. regium* resultando no isolamento das substâncias **1 - 6**.

4.1.2.4 Material e métodos empregados para análise das frações e substâncias isoladas

Para análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasmas de celulose microcristalina em suporte de vidro (Merck), sílica gel GF₂₅₄ sob suporte de vidro e alumínio (Merck) e sílica gel 60 G preparadas extemporaneamente. A revelação das substâncias foi obtida sob luz ultra-violeta (254 e 366 nm), pela exposição a vapores de iodo ou pela nebulização do reagente *Natural Products* (NP/PEG, aminoetiléster difenilborínico/ polietilenoglicol) ou cloreto férrico 5%, considerando a classe química prevalente na fração analisada (108).

Para o fracionamento em coluna foram utilizados sílica gel 60 (230-400 mesh, 40-60 µm, Merck) e Sephadex LH-20 (25-100 µm, Sigma) em colunas de vidro com diâmetros de 3,5 e 5 cm e alturas variáveis. As frações obtidas foram analisadas por CCD reunindo-se as frações semelhantes.

Nos processos cromatográficos em camada delgada e coluna aberta e na purificação das frações isoladas por recristalização, foram empregados solventes de grau analítico (PA). Clorofórmio e acetato de etila foram previamente destilados para uso como eluentes em colunas cromatográficas.

Após purificação, os pontos de fusão das substâncias **1**, **3** e **6** foram determinados em equipamento Marconi, modelo MA381.

As técnicas espectrais utilizadas para identificação molecular das substâncias isoladas foram: espectrofotometria de ultravioleta (UV) e infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM). Quando necessário, foi utilizado o programa ACDLABS para manipulação dos espectros.

Os espectros de RMN uni (¹H, ¹³C e DEPT 135°) e bidimensionais (gHMBC e gHSQC) foram registrados em aparelho Bruker, modelo DPX-300, em 300 MHz para RMN ¹H e 75 MHz para ¹³C (Departamento de Química, UFMS). As amostras foram solubilizadas em CDCl₃, DMSO-*d*₆, CD₃OD e C₃D₆O. Como referência interna foi utilizado o sinal do tetrametilsilano (TMS).

Os espectros de absorção na região do IV foram obtidos em espectrofotômetro de Bomem-Hartmann e Braum, modelo Michelson MB series, FT-IR, empregando pastilhas de KBr (Departamento de Química, UFMS).

Para obtenção dos espectros de massas das substâncias **1**, **3**, **4**, **5** e **6**, foi utilizado espectrômetro Brucker, modelo ultrOTOF_Q-ESI-TOF, com bomba de infusão, fluxo de 3000 µL/h, em modo de detecção negativo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP-Ribeirão Preto). A calibração interna foi realizada com solução de ácido trifluoracético sodiado (10,0 mg/mL) e a calibração externa, com solução de formiato de sódio 10 mM.

A mistura **7** e **8** foi analisada por cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (GC-EM) em equipamento Shimadzu modelo QP-2010 equipado com injetor *split/splitless* mantido a 280 °C e coluna DB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP-Ribeirão Preto). Foi utilizado Hélio como gás de arraste em fluxo de 1,3 mL/min. A razão do *split* foi de 1:30 e o volume injetado de amostra de 1,0 µL. A temperatura da coluna foi mantida constante a 300 °C, durante um tempo total de análise de 120 min. A temperatura de interface foi de 280 °C e a fonte de íons foi de 250 °C. O modo de ionização ocorreu por impacto de elétrons a 70 eV.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi utilizada para análise qualitativa da substância **4** (galato de etila) no extrato bruto metanólico. O experimento ocorreu em modo analítico e isocrático utilizando cromatógrafo Varian Pró-Star/Dynamax 24 com bomba isocrática Pró-Star 210, detector de ultra-violeta Pró-Star 320, injetor com *loop* de 50 µL (Rheodyne 7725) e coluna de fase reversa Omnispher 5-C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm) em sistema Chromsep, com pré-coluna de igual fase fixa (Curso de Farmácia da Universidade Anhanguera-Uniderp). Os cromatogramas foram analisados e integrados pelo *software* Varian-Star Chromatography versão 5.31. A eluição foi realizada com acetonitrila:água (1:1), previamente desgaseificada por sonicação à vácuo, em fluxo de 1 mL/min e detecção em 270 nm. A solução padrão de **4** e a solução amostra (extrato metanólico seco) foram preparadas na concentração de 50 µg/mL utilizando acetonitrila:água (1:1) como diluente, filtradas em filtro de nylon de 0,45 µm (Titan) e injetadas em *loop* com capacidade para 50 µL. A acetonitrila utilizada foi grau espectroscópico (JBaker, Merck) e a água do tipo Milli-Q.

4.1.3 Determinação da capacidade antimicrobiana

As amostras foram avaliadas pela técnica de difusão em ágar utilizando meio Müller-Hinton e cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.

Discos de papel de filtro estéreis (6 mm de diâmetro e 0,9 mm de espessura) foram impregnados com 10 µL de cada solução amostra. Foram avaliadas as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, butanólica e hidroetanólica (antes e após partição, Figura 14) e as substâncias isoladas **1**, **3** e **5**. Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 100,0 mg/mL, de forma a serem obtidos discos impregnados com 1,0 mg de amostra. Mediante o rendimento adquirido pelo fracionamento químico, as substâncias isoladas foram avaliadas em soluções mais diluídas (10 mg/mL, DMSO) resultando em discos impregnados com 100,0 µg/mL.

As suspensões das bactérias foram preparadas diluindo-se o inóculo em solução salina até atingir turbidez comparável a um padrão de 0,5 da escala de McFarland, com absorvância de 0,08 a 0,10 nm em espectrofotômetro de ultravioleta (Femto), operado em 625 nm, visando obter soluções na concentração de 1.10^8 UFC/ mL (109).

Após inoculação da bactéria no meio de cultura, três discos de cada amostra foram depositados e a leitura do halo de inibição foi realizada após 24 h de incubação à 37 °C, conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (109).

O controle positivo foi obtido com discos de gentamicina padrão (10,0 µg, Cecon) e o controle negativo com discos impregnados com 10,0 µL de DMSO. Cada amostra foi observada em triplicada e, mediante resultado positivo, a análise foi reproduzida fornecendo o valor do halo de inibição, em mm, expresso pela média e desvio padrão de seis leituras.

4.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FARMACOGNÓSTICOS

4.2.1 Material botânico

Os parâmetros farmacognósticos foram avaliados em amostras nativas do cerrado coletadas bimestralmente no Campus III/ da Universidade Anhanguera-Uniderp (latitude 20°26'14'', longitude 54°32'14''), nas primeiras quinzenas dos meses de fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro de 2008, no período da manhã. A exsicata testemunha utilizada para ratificação taxonômica de cada coleta, encontra-se catalogada no Herbário CG/MS, Campo Grande (MS), sob registro no. 23466.

A raiz foi submetida à limpeza em água corrente retirando sua casca para processamento semelhante ao uso tradicional. A fragmentação manual foi realizada com faca de aço inoxidável fornecendo partículas menores do que 1 cm. Este material foi seco em estufa com ventilação de ar a 40 °C, pulverizado em processador de alimentos (Wallita) seguido de micromoinho elétrico de facas (Tecnal 648) com tela de 2 mm.

As amostras pulverizadas foram tamisadas seguindo o método para determinação da distribuição granulométrica do pó com auxílio de vibrador automático de peneira (Betel) empregando tamises de malhas 20 (0,840 mm), 50 (0,300 mm) e 60 (0,250 mm), conforme descrito no item 4.2.3.1. O produto final obtido no recipiente coletor foi utilizado para a determinação dos parâmetros físico-químicos e para análise química quali e quantitativa por CCD e CLAE.

A preparação das amostras e os experimentos físico-químicos foram realizados nos Laboratórios de Solos e de Bromatologia da Universidade Anhanguera-Uniderp. A análise por CLAE em modo isocrático foi realizada na Sala de Cromatografia da Universidade Anhanguera-Uniderp e, as análises por CCD e CLAE-DAD foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia da UFMS.

4.2.2 Características organolépticas e descrição botânica

Os aspectos relacionados com a cor, odor e sabor, foram descritos para a raiz fresca e seca, antes e após pulverização. Através de análise visual, foram descritas as características que envolvem o produto seco íntegro como: comprimento, largura, diâmetro, forma, secção transversal, entre outros fatores de igual relevância (110).

O corte transversal da área mediana de cada raiz fresca foi submetido à secção transversal manual, montagem das lâminas extemporâneas com água e análise histoquímica. Para melhor visualização de algumas estruturas, também foi realizada análise de amostra fixada em formol-álcool-ácido acético (FAA 50%), desidratada em série alcoólica, xilol e parafina conforme descrito por Johansen (110) e Souza *et al.* (112). Após emblocamento em parafina, os cortes foram realizados em micrótomo (Micron HN 325) com espessura de 15 micras para preparação das lâminas permanentes.

As técnicas microquímicas foram direcionadas para observação de tecidos (parênquima, colênquima e esclerênquima), amido, compostos fenólicos, mucilagens e lipídeos utilizando, respectivamente, safranina - azul de astra, lugol, cloreto férrico 10% e azul de metileno 1,5% (111-113).

A fotodocumentação dos resultados foi obtida em fotomicroscópio Axiolab (MC 80 DX, HBO 50/AC-Zeiss) vinculado ao programa Imagelab 2000, disponível no Laboratório de Pesquisa em Histopatologia e Biologia Molecular da Universidade Anhanguera-Uniderp.

4.2.3 Parâmetros físico-químicos

4.2.3.1 Distribuição granulométrica, densidade aparente e por compactação

A caracterização granulométrica do pó da droga foi verificada através de técnica farmacopêica adaptada, onde a droga moída (100 g) foi tamisada com os tamises 20, 50 e 60, em seqüência, até total peneiramento, sob vibração automática

em intensidade 5 (Betel) (114). A quantidade de droga obtida pela tamisação de cada malha foi quantificada em percentagem e o padrão granulométrico foi determinado de acordo com a indicação farmacopêica para pó grosso, moderadamente grosso, semi-fino, fino e finíssimo. O cálculo para determinação do diâmetro médio das partículas foi realizado a partir da fórmula (115):

$$d = \frac{\sum(\% \text{ retida}) \cdot (\text{abertura média da malha})}{100}$$

onde,
d= diâmetro médio das partículas

Para a determinação das densidades aparente e por compactação foram utilizadas as amostras pulverizadas com distribuição granulométrica abaixo de 250 µm (obtidas no coletor após o ensaio acima citado) estabelecendo a razão entre massa e volume empregando proveta de 50 mL, conforme fórmula (115 e 116):

$$d = m \cdot v^{-1}$$

onde,
d= densidade da amostra; **m**= peso da amostra em g; **v**= volume da amostra em mL.

A densidade aparente foi verificada pela capacidade de massa (em g) em volume fixo de 50 mL sem haver compactação da droga. A densidade compactada foi verificada após compactação manual do pó da droga presente na proveta de 50 mL após determinação da densidade aparente. A compactação foi realizada até estabilização através de movimentos verticais e ritmados sob uma almofada dinamizadora de uso em homeopatia (anteparo firme e macio) (115 e 116). Os resultados foram expressos pela média seguido do desvio padrão a partir de três repetições.

4.2.3.2 Determinação de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido

Os ensaios para determinação de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido foram realizados empregando as técnicas gravimétricas descritas pela

Farmacopéia Brasileira IV (114). As pesagens para cada ensaio foram repetidas até estabilização do peso e os resultados foram expressos em porcentagem após cálculo da média e desvio padrão de três determinações.

A determinação de umidade foi efetuada com a raiz fresca fragmentada (10 g, partículas menores do que 1 cm) e com a droga pulverizada (3 g) utilizando aquecimento em estufa a 100-105 °C, durante 5 horas.

O teor de cinzas totais foi adquirido a partir de 3 g de droga pulverizada, carbonizada em fogo direto e incinerada em mufla a 450 °C, durante 5 horas, até peso constante. O teor de cinzas totais foi determinado em porcentagem considerando a droga isenta de umidade.

As cinzas totais foram tratadas com 25 mL de ácido clorídrico diluído (70 g/L), sob ebulição, por 5 minutos, em cadinho coberto com vidro relógio. A solução foi filtrada lavando-se o vidro relógio e o papel de filtro isento de cinza com água quente até que o filtrado não se mostrasse ácido. O papel de filtro foi transferido para o cadinho original, seco em chapa quente e incinerado em mufla a 500 °C, durante 5 horas. O resultado em porcentagem foi calculado a partir da droga isenta de umidade.

4.2.3.3 Perfil cromatográfico (*fingerprint*)

4.2.3.3.1 Por cromatografia em camada delgada

A raiz pulverizada (2 g, coletada em outubro) foi extraída com 20 mL de etanol:água (7:3) por sonicação durante 10 minutos. Ao sobrenadante (2 mL) foi adicionado 5 mL de água e realizada partição com 5 mL de acetato de etila. Foram analisados o extrato hidroalcoólico e a fração acetato de etila utilizando como padrão o diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo e ácidos gálico e elágico (solubilizados em metanol). As cromatoplasmas foram preparadas com 10 μ L de cada solução.

Para determinação do *fingerprint* por CCD foram utilizadas cromatoplasmas de sílica gel GF₂₅₄ sobre suporte de vidro (Merck), vários eluentes apropriados para polifenóis e revelação com luz ultra-violeta (254 e 366 nm), iodo sublimável e

nebulização do reagente NP/PEG ou solução metanólica de cloreto férrico 5 %, conforme orientado Wagner *et al.* (107) para análise de metabólitos secundários fenólicos.

4.2.3.3.2 Por cromatografia líquida de alta eficiência

O estudo em CLAE foi realizado em modo isocrático e em gradiente, utilizando diferentes eluentes e fluxos direcionados para melhor resolução dos cromatogramas.

Para estudo com eluição isocrática foi empregado cromatógrafo Varian Pró-Star/Dynamax 24 conforme informado no item 4.1.2.4 (análise qualitativa da substância 4). A amostra foi preparada com o extrato seco hidroetanólico preparados a partir da evaporação total em banho-maria (50 °C) ressuspensos em metanol na proporção de 1:9.

Para o experimento com eluição em gradiente foi utilizado cromatógrafo Shimadzu com módulo de comunicação CBM-20A, com duas bombas LC20AD, injetor com *loop* de 20 µL, coluna ODS (250 x 4,6 mm x 5 µm), pré-coluna de igual fase fixa e detector UV/Vis com arranjo de fotodiodo modelo SPD-M20A ajustado para 210-600 nm. O monitoramento dos cromatogramas foi realizado em 266, 294 e 360 nm, com análise e integração pelo *software* Shimadzu LC-Solution. A raiz seca e pulverizada (50 mg) foi extraída por infusão com 10 mL de água fervente e submetida à centrifugação por 5 min (5000 rotações por minuto).

Todos os solventes orgânicos para o estudo em CLAE foram de grau espectroscópico (JBaker ou Merck) e a água do tipo Milli-Q. Os eluentes foram degaseificados em banho de ultra-som sob vácuo (10 min) e todas as amostras injetadas foram previamente filtradas em filtro de nylon de 0,45 µm (Titan).

Os padrões de ácido elágico e diidrokaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo foram obtidos do fracionamento químico com teor de pureza de 97,4 e 79,2 %, respectivamente. O ácido gálico utilizado foi padrão analítico (Sigma).

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

O estudo quantitativo de ácido gálico e diidrokaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo foi realizado por CLAE-DAD empregando padrão externo correlacionando a área do analito com a curva de calibração dos padrões.

O cromatógrafo utilizado foi Shimadzu utilizando o sistema de eluição e detecção que forneceu perfil cromatográfico de melhor resolução, conforme descrito no item anterior. Sendo assim, a eluição ocorreu em modo gradiente com água (eluente A) e metanol (eluente B), ambos com 1% de ácido acético, em fluxo de 0,8 mL/min e detecção em 294 nm. O gradiente de B foi realizado conforme: 10% de 0-3 min; 10-35% de 3-10 min; 35-60% de 10-40 min; 60-100% de 40-43 min; 100% de 43-45 min; 100-10% de 45-48 min; e 10% de 45-48 min. Após 43 min a eluição foi realizada visando o retorno das condições iniciais e estabilidade do sistema para análise de nova amostra.

Para construção das curvas de calibração foi utilizado ácido gálico padrão analítico (Sigma) e o diidrokaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo obtido no isolamento químico. A pureza desse flavonóide foi calculada em 79,23% ($\pm 0,096$) a partir da proporção da área do pico cromatográfico com a área total das substâncias observadas por CLAE-DAD em solução de 200 µg/mL injetada em triplicata.

A curva de calibração do ácido gálico foi construída nas concentrações de 1,95; 3,96; 7,81; 15,62 e 31,25 µg/mL, com detecção em 266 nm, e do flavonóide nas concentrações de 62,5, 100, 180, 200, 250 e 500 µg/mL, com detecção em 294 nm.

As soluções padrão foram preparadas seqüencialmente com metanol:água (6:4) a partir de solução mãe de 1000 µg/mL. Cada diluição foi injetada em duplicata e, havendo resultados de área discordantes em mais de 5%, foi realizada nova injeção da amostra. A partir do valor médio de cada diluição foram construídas as equações de regressão para cada analito apontando os respectivos coeficientes de correlação linear (R) e as faixas de linearidade, conforme exigência legal para validação da linearidade do método (117).

A análise quantitativa foi realizada com as seis amostras coletadas durante o ano de 2008 (item 4.2.1). As raízes pulverizadas (50 mg) foram extraídas com 10 mL de metanol:água (6:4), em banho de ultra-som por 10 min seguido de centrifugação

por 5 min (5000 RPM). As soluções foram preparadas extemporaneamente e filtradas em filtro de 45 μm antes de serem injetadas. Cada solução foi analisada em duplicata realizando nova introdução de amostra com resultados de área discordantes em mais de 5%. Os resultados foram expressos pela média seguido do desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FRACIONAMENTO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Inicialmente, foi realizado o fracionamento químico para se conhecer o perfil de metabólitos secundários de *C. regium* e selecionar os potenciais marcadores químicos, imprescindíveis na análise quali (*fingerprint*) e quantitativa de drogas vegetais. Considerando que os marcadores químicos devem ser prioritariamente substâncias ativas (9), tanto o extrato bruto hidroalcoólico como as frações seqüenciais e algumas substâncias isoladas foram avaliadas pelo ensaio antimicrobiano. Este ensaio acompanhou o estudo químico por estar associado ao uso tradicional da raiz para o tratamento de inflamações e infecções e por apresentar baixo custo, facilidade e reprodutibilidade (118).

A busca por substâncias bioativas proveniente de plantas medicinais pode ser direcionada por diferentes métodos estando, entre eles, a análise química e biológica do material vegetal processado de acordo com a indicação popular (2, 119). Sendo assim, o conhecimento da comunidade sobre o processo de coleta e limpeza, bem como a técnica extrativa (maceração, infusão, decocção), o tipo de solvente extrator (vinho, vinagre, água, aguardente) e a forma de uso, podem ser importantes indicativos para o sucesso no isolamento de compostos ativos.

Nesta etapa da pesquisa, a natureza química dos metabólitos secundários potencialmente ativos presentes na raiz de *C. regium* foi verificada através do fracionamento do extrato hidroalcoólico obtido por maceração. O uso da solução hidroalcoólica como veículo extrator buscou similaridade com o vinho, água e álcool, solventes capazes de solubilizar substâncias polares e usualmente, utilizadas na fitoterapia popular para preparação de “chás e garrafadas”. A extração exaustiva da raiz de *C. regium* foi realizada por remaceração sendo o macerado concentrado até consistência xaroposa e submetido a partições líquido-líquido em gradiente de polaridade (Figura 17). O rendimento do extrato hidroalcoólico a partir da raiz seca foi de 28% (g/g) sendo constituído em maior proporção por substâncias solúveis em etanol:água (54,2%) e acetato de etila (38,6%) (Figura 17 e Tabela 2).

Tabela 2 – Rendimento (% p/p) das frações obtidas por partição no extrato hidroalcoólico e na raiz seca de *C. regium*

Amostras	Rendimento (%) no extrato hidroalcoólico	Rendimento (%) na raiz seca
Fração hexânica	1,2	0,4
Fração clorofórmica	1,7	0,7
Fração acetato de etila	38,6	16,9
Fração butanólica	4,3	1,9
Fração hidroalcoólica	54,2	23,9

Conforme Cechinel-Filho e Yunes (119) e Zuanazzi e Montanha (120), o fracionamento químico de plantas medicinais iniciado com o uso de solventes extratores de polaridade crescente é viável para separação prévia de diferentes classes químicas. Afirmam que, o solvente acetato de etila é capaz de extrair flavonóides menos polares, xantonas, ácidos triterpenos, compostos fenólicos não tânicos e outros metabólitos menos polares, enquanto que, as substâncias de maior polaridade como taninos, agliconas poli-hidroxiladas, saponinas e outros glicosídeos, devem estar presentes em extratos hidroalcoólicos (água:butanol, água:metanol, água:etanol).

O ensaio para determinação da atividade antimicrobiana realizado com o extrato bruto e frações de *C. regium* evidenciou efeito inibitório de todas as amostras testadas sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa* e ausência de atividade sobre *E. coli*, *E. faecalis* e *K. pneumoniae*.

Dentre os dois microorganismos inibidos, *C. regium* mostrou maior atividade sobre *S. aureus* destacando os resultados obtidos com o extrato bruto hidroalcoólico (16,4 mm) e frações AcOEt (15,0 mm) e BuOH (13,8 mm) (Tabela 3). A inibição de *P. aeruginosa* foi sutil formando halos entre 7,0 e 9,5 mm, porém, ressaltou os efeitos da fração AcOEt (9,5 mm) e do extrato bruto hidroalcoólico (9,0 mm) e mostrou maior inibição das frações menos polares (Hex: 8,3 mm; CHCl₃: 8,0 mm) quando em comparação com a inibição observada com as frações BuOH (7,6 mm) e EtOH/H₂O (7,0 mm) (Tabela 3).

Estudo semelhante foi realizado por Oliveira *et al.* (68) que registraram efeito inibitório da raiz de *C. regium* sobre cepas selvagens de *S. aureus* e *E. coli* obtidas de pacientes do Hospital Universitário-UFMS e isoladas no Laboratório de Microbiologia-UFMS. Estes autores, afirmaram que o extrato hidroalcoólico e a fração AcOEt possuem atividade semelhante e maior do que a fração BuOH.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com aqueles obtidos por Oliveira *et al.* (68) no que se refere à análise sobre *S. aureus* apontando atividade do extrato bruto hidroalcoólico e enriquecimento das substâncias ativas na fração AcOEt, porém, não estão de acordo com relação a inibição de *C. regium* frente a *E. coli*.

Tabela 3 – Potencial antimicrobiano de diferentes frações obtidas da raiz de *C. regium* frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*

Amostras	Halo de inibição (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Extrato bruto hidroalcoólico	16,4 ± 1,34	9,0 ± 1,00
Extrato hexânico	9,8 ± 0,44	8,3 ± 0,51
Extrato clorofórmico	10,0 ± 0,44	8,0 ± 1,26
Extrato acetato de etila	15,0 ± 0,70	9,5 ± 0,55
Extrato butanólico	13,8 ± 1,92	7,66 ± 0,81
Fração hidroalcoólica	12,8 ± 1,30	7,00 ± 0,00
Gentamicina	22,0 ± 0,00	22,0 ± 2,8
DMSO	0	0

O fracionamento químico forneceu cinco derivados fenólicos [ácido elágico (**1**), diidrokaempferol (**2**), ácido gálico (**3**), galato de etila (**4**), diidrokaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo (**5**), e diidrokaempferol-3-O-β-(6''-galoil)-glicopiranosídeo (**6**)], e dois triacilbenzenos, conhecidos como cochlosperminas A (**7**), e B (**8**). Com exceção do diidrokaempferol (**2**) e seu glucosídeo (**5**), é a primeira vez que as substâncias isoladas são reportadas nesta espécie e o registro do diidrokaempferol-3-O-β-(6''-galoil)-glicopiranosídeo (**6**) é inédito na literatura. A elucidação estrutural de cada substância é apresentada a seguir (tópico 5.2).

O resultado fitoquímico desta pesquisa fortalece o padrão quimiotaxonômico do gênero já descrito na literatura, que reporta a presença de flavonóides, triacilbenzenos, taninos gálicos e elágicos em diferentes espécies de *Cochlospermum* (74-80, 92).

Mediante rendimento, somente as substâncias **1**, **3** e **5** foram submetidas ao ensaio antimicrobiano com discos impregnados com 0,1 mg. Os resultados mostraram importante efeito inibitório do ácido gálico (**3**) (14,0 mm) somente sobre *S. aureus* e ausência de atividade do ácido elágico (**1**) e do diidrokaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo (**5**) frente a todos os microorganismos testados (Tabela 4). O conhecimento biológico destas substâncias é registado na literatura e justifica os resultados observados no ensaio antimicrobiano (68, 69, 120-131).

Os ácidos gálico (**3**) e elágico (**1**) estão relacionados com os taninos hidrolisáveis que possuem ação adstringente, antimicrobiana e antifúngica, justificando as inibições no crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa* dos extratos mais polares de *C. regium* (120-131).

O benefício antimicrobiano do ácido gálico (**3**) motivou a patente de um gel para o tratamento de infecção vaginal fornecendo sustentação ao uso popular do decocto da raiz de *C. regium* em banho de assento (127). Conforme a literatura, o flavonóide (**5**) é dotado de ação antinoceptiva e não possui ação antimicrobiana reforçando o resultados observados (68,69) (Tabela 4).

Tabela 4 – Potencial antimicrobiano das substâncias **1**, **3** e **5** isoladas da raiz de *C. regium* frente a *S. aureus*

Amostras	Halo de inibição (mm) <i>S. aureus</i>
Substância 1	0
Substância 3	14,0 ± 0,70
Substância 5	0
Gentamicina	22
DMSO	0

5.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA RAIZ DE *C. regium*

5.2.1 Substância 1

A substância **1** (500 mg) foi obtida por precipitação espontânea na fração hidroetanólica após, aproximadamente, 15 dias de repouso em geladeira (± 10 °C). Caracterizou-se como um sólido amarelo, pouco solúvel em acetona e metanol, decompondo-se totalmente em 360 °C. O comportamento por CCD indicou Rf 0,2 após eluição com clorofórmio:ácido acético:metanol:água (64:32:12:08) em cromatoplaças de celulose microcristalina. Essa substância (10 mg) também foi obtida pelo refractionamento cromatográfico em coluna por adsorção (sílica) seguido de permeação em gel (Sephadex LH20) partindo do extrato acetato de etila (Figura 17).

Os espectros obtidos por RMN, tanto de ^1H (simpleto intenso em δ 7,4) como de ^{13}C (5 sinais entre δ 110,43 e 159,95), indicaram natureza aromática e presença de carbonila de éster (δ 159,95) (Figura 20). O único e intenso simpleto em δ 7,4 fornecido por ^1H correlacionado com apenas um sinal em δ 110,43 observado em DEPT 135° apontam a presença de apenas um carbono metínico, sendo os outros carbonos quaternários (Figuras 20-22).

A análise espectroscópica para determinação da massa molecular forneceu pico do íon molecular m/z 300,9984, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_5\text{O}_8^-$ (Figura 23).

Os resultados espectrais associados ao comportamento por CCD, ponto de fusão e solubilidade, quando em comparação com amostra autêntica e dados da literatura, possibilitaram a identificação da substância 1 como sendo o ácido elágico, molécula simétrica com 2 carbonos equivalentes metínicos (5,5') e 12 carbonos quaternários equivalentes de par em par (C1,1'; C2,2'; C3,3'; C4,4'; C6,6'; C7,7') (Figura 19, Tabela 5) (125, 129, 130).

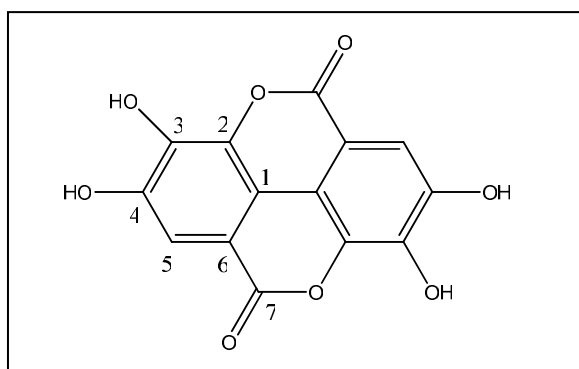


Figura 19 – Estrutura molecular da substância 1 (ácido elágico).

Tabela 5 – Comparação entre os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) da substância **1** e dados da literatura para o ácido elágico

C	Substância 1 *		Ácido elágico** (125)	
	^1H δ (M)	^{13}C δ	^1H δ (M)	^{13}C δ
1,1'	-	106,87	-	107,58
2,2'	-	136,33	-	136,37
3,3'	-	140,49	-	139,63
4,4	-	148,27	-	148,11
5,5'	7,57 (s)	109,85	7,44 (s)	110,20
6,6'	-	112,51	-	112,32
7,7'	-	159,20	-	159,13

*TMS δ 0; DMSO- d_6 ; ^1H 300 MHz; ^{13}C 75 MHz.

** TMS δ 0; DMSO- d_6 ; ^1H 200 MHz; ^{13}C 50,3 MHz.

O ácido elágico é produto da hidrólise de taninos hidrolisáveis formados por unidades de ácido hexahidroxi-difenólico esterificadas com unidades de glicose (taninos elágicos). Sendo assim, a presença abundante de ácido elágico na fração hidroetanólica de *C. regium* caracterizou a degradação química dos taninos elágicos que ocorreu durante o processo extrativo (131).

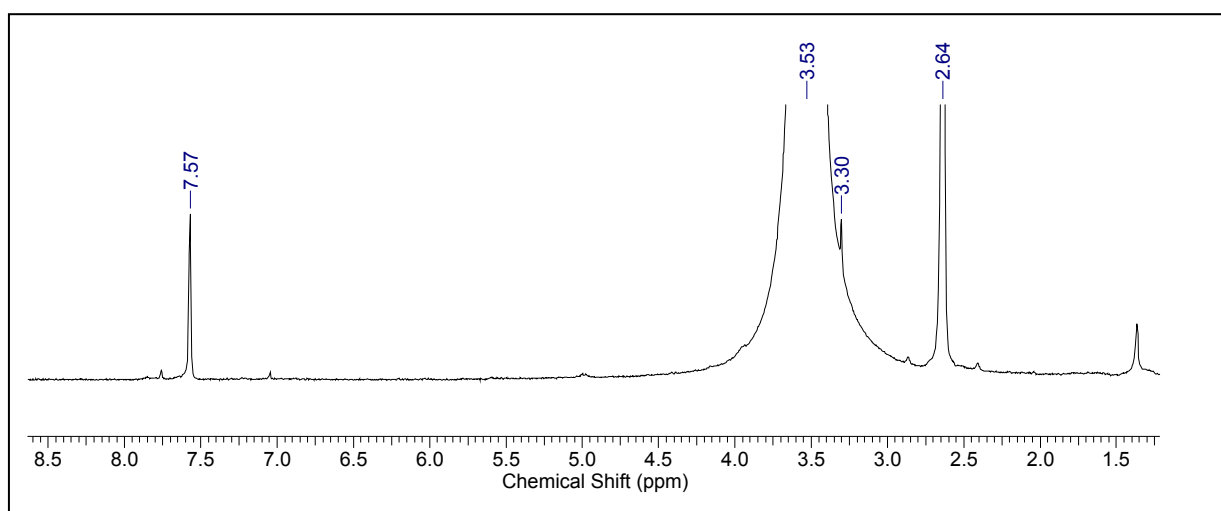


Figura 20 – Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) da substância **1**, na região entre δ 1,3 e 8,5.

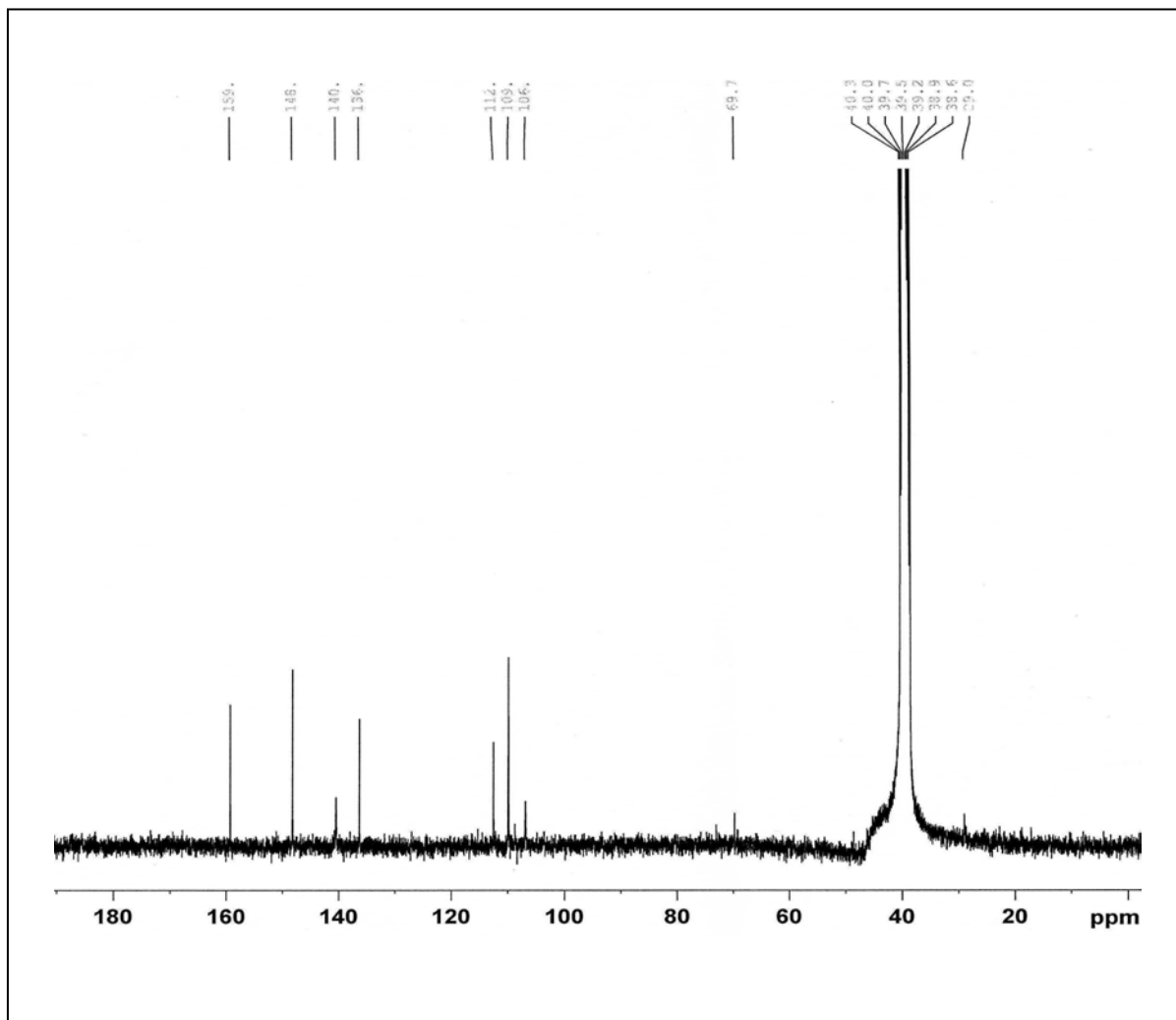


Figura 21 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) da substância 1.

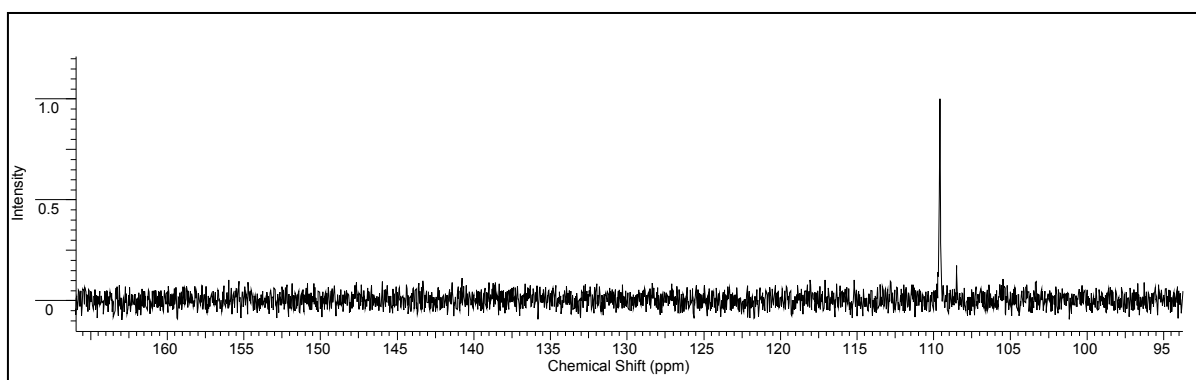


Figura 22 - Expansão do espectro de DEPT 135° (75 MHz, DMSO- d_6) da substância 1, na região entre δ 95 e 170.

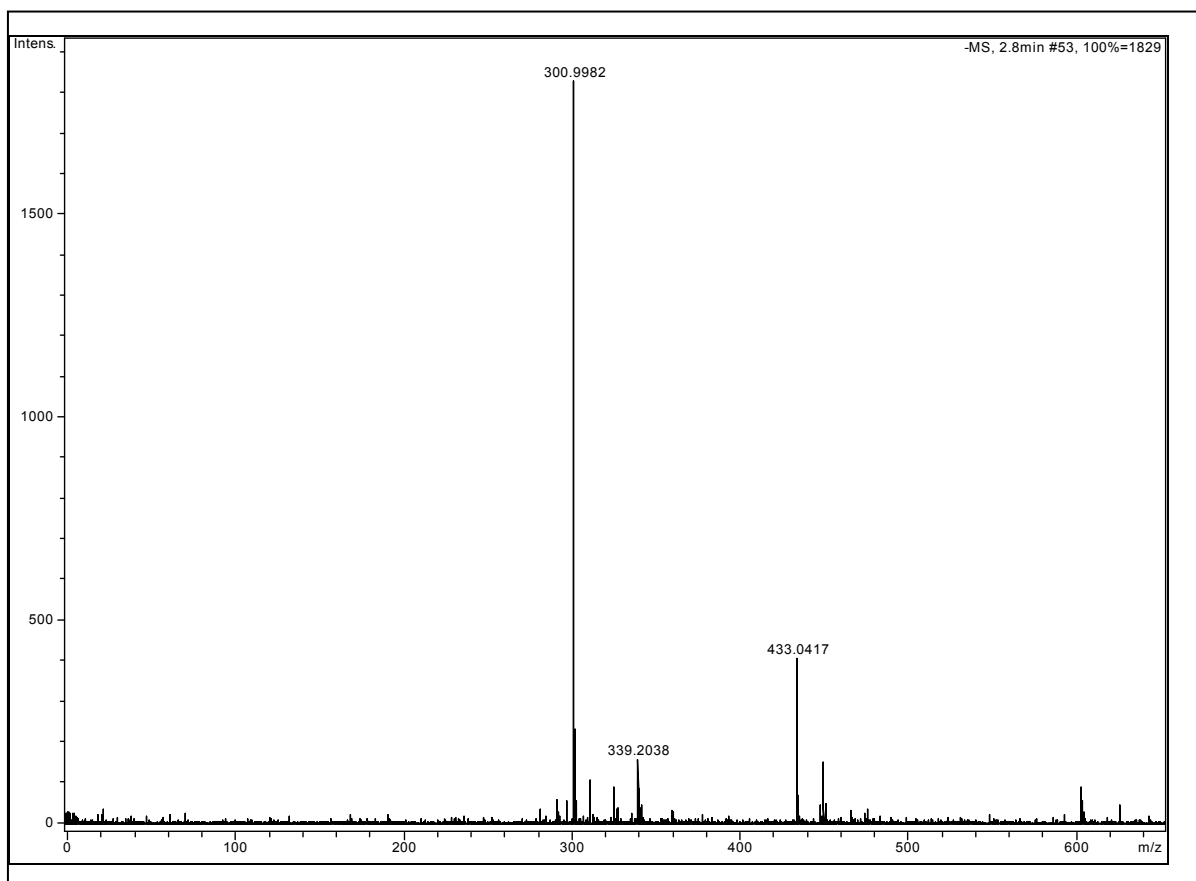


Figura 23 – Espectro de massas da substância **1** no modo de íon negativo.

5.2.2 Substância 2

A substância **2** (4 mg) foi obtida do extrato acetato de etila após fracionamento em coluna de sílica (Figura 15) e caracterizou-se como um cristal acicular incolor, muito solúvel em acetato de etila e metanol. A análise por CCD mostrou mancha majoritária com Rf 0,68 após eluição com clorofórmio:metanol (8:2) seguido de revelação com NP/PEG ou iodo sublimável, em cromatoplaça de sílica gel.

As análises espectrais por RMN ^1H e ^{13}C forneceram conjunto de sinais característico de um flavanonoil hidroxilado em C5, C7 e C4' (Figura 25). O anel A hidroxilado nas posições 5 e 7 foi proposto com base nos simpletos largos observados em δ 5,94 (H6) e 6,00 (H8) e pelos sinais dos carbonos metínicos em δ 96,73(C6) e δ 95,84 (C8) (Figuras 25 e 26) (132-134).

Na região de sinais relativos aos hidrogênios aromáticos foram observados dois dupletos em δ 7,38 e 6,87 que acoplaram entre si (J 8,4 Hz) e mostraram integração de 2 H, peculiares de acoplamento *orto* de um esqueleto flavonoídico com anel B *para* substituído. Esta proposta foi confirmada por ^{13}C onde a maior intensidade dos sinais em δ 129,04 e δ 115,51 reforçou o padrão de substituição *para* do anel B pela equivalência dos ambientes eletrônicos entre C2'- C6' e C3 - C5' (Figura 22) (132-134).

Dois carbonos metínicos carbinólicos peculiares de um flavanonol foram atribuídos ao anel C, onde os hidrogênios de C2 e C3 foram observados como dupletos em δ 4,96 e δ 4,52 com constante de acoplamento (J) de 11,9 Hz, indicando haver configuração *trans* entre eles. Os carbonos C2, C3 e C4 foram, respectivamente, observados em δ 83,32, 72,28 e 196,13, comprovando ausência de ligação olefínica entre C2 e C3 e presença de carbonila em C4 (Figura 25 e 26) (134).

Os sinais em δ 3,91 (^1H) e δ 56,28 (^{13}C e DEPT 135°) sugeriram a presença de uma metoxila ligada à C5, C7 ou C4' (Figura 25-27) (132-133).

O conjunto de sinais espectrais obtidos por RMN ^1H e ^{13}C permitiu caracterizar a substância **2** como a genina diidrokaempferol conhecida como aromadendrina ou seu derivado metoxilado (Figura 24). A elucidação inequívoca foi obtida pelo espectro de massas empregando ionização *electrospray* no modo de ionização negativo que forneceu íon molecular m/z 287,05 $[\text{M}]^-$ relativo a fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_6^-$, bem como de seu aduto dímero em m/z 576,12, reforçando a identidade da substância **2** como o diidrokaempferol (Figura 28). Desta forma, os sinais de metoxila obtidos por ^1H , ^{13}C e DEPT 135° podem estar associados à impureza, que também foi detectada por CCD.

A Tabela 6 apresenta a comparação entre os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) da substância **2** e dados da literatura para o diidrokaempferol (92).

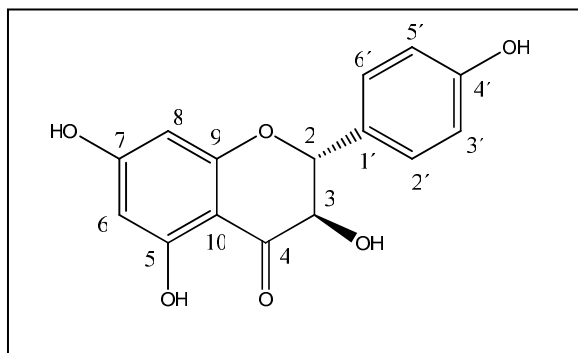


Figura 24 – Estrutura molecular da substância **2** (dihidrokaempferol).

Tabela 6 – Comparação entre os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) da substância **2** e dados da literatura para o diidrokaempferol

Posição	Tipo de C	Substância 2*		Dihidrokaempferol** (92)	
		^1H δ (M, J em Hz)	^{13}C δ	^1H δ (M, J em Hz)	^{13}C δ
2	CH	4,97 (d, 11,9)	83,32	5,2 (d, 10,2)	85,3
3	CH	4,52 (d, 11,9)	72,28	4,9 (d, 10,2)	74,0
4	C	-	196,13	-	198,8
5	C	-	167,42	-	165,6
6	CH	5,94 (s)	96,73	5,8 (d, 2,1)	97,7
7	C	-	173,67	-	169,1
8	CH	6,00 (s)	95,84	5,9 (d, 2,1)	96,7
9	C	-	163,13	-	164,9
10	C	-	107,13	-	102,2
1'	C	-	127,42	-	129,6
2'	CH	7,38 (d, 8,4)	129,04	7,3 (d, 8,6)	130,7
3'	CH	6,87 (d, 8,4)	115,51	6,8 (d, 8,6)	116,5
4'	C	-	157,75	-	159,5
5'	CH	6,87 (d, 8,4)	115,51	6,8 (d, 8,6)	116,5
6'	CH	7,38 (d, 8,4)	129,04	7,3 (d, 8,6)	130,7

* TMS δ 0; CDCl_3 ; ^1H 300 MHz; ^{13}C 75 MHz.

**TMS δ 0; CD_3OD ; ^1H 300 MHz; ^{13}C 75 MHz.

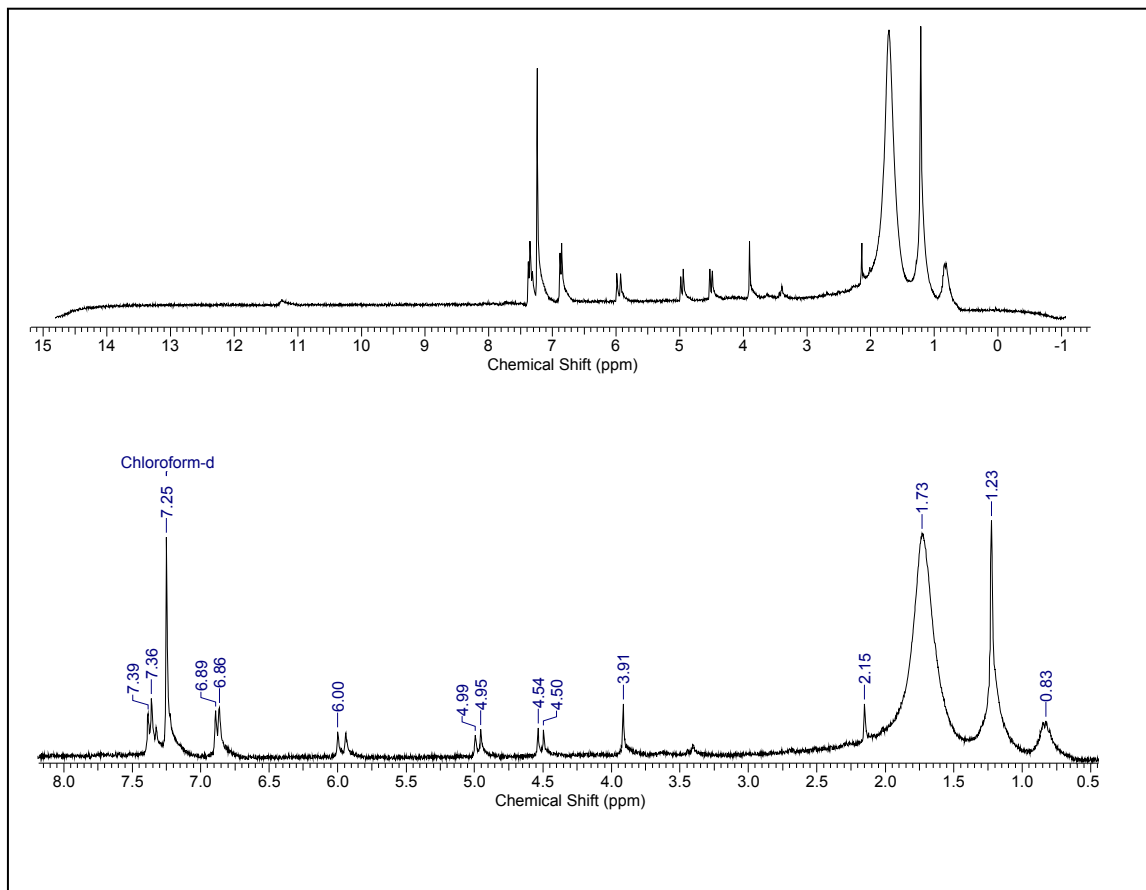


Figura 25 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância **2** e expansão na região entre δ 0,5 e 8,0.

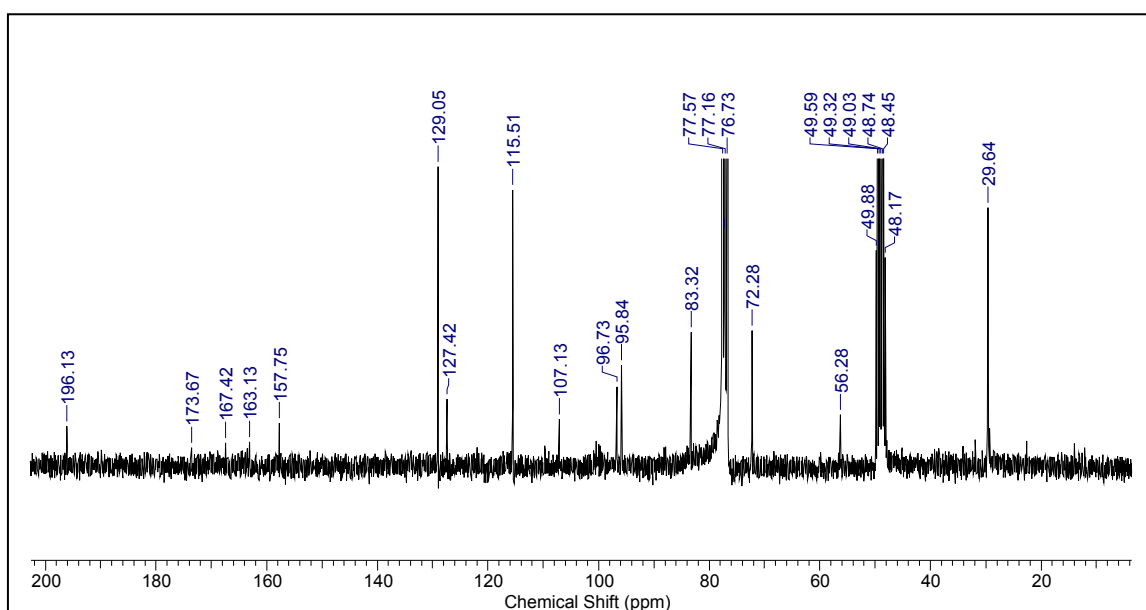


Figura 26 – Espectros de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância **2**.

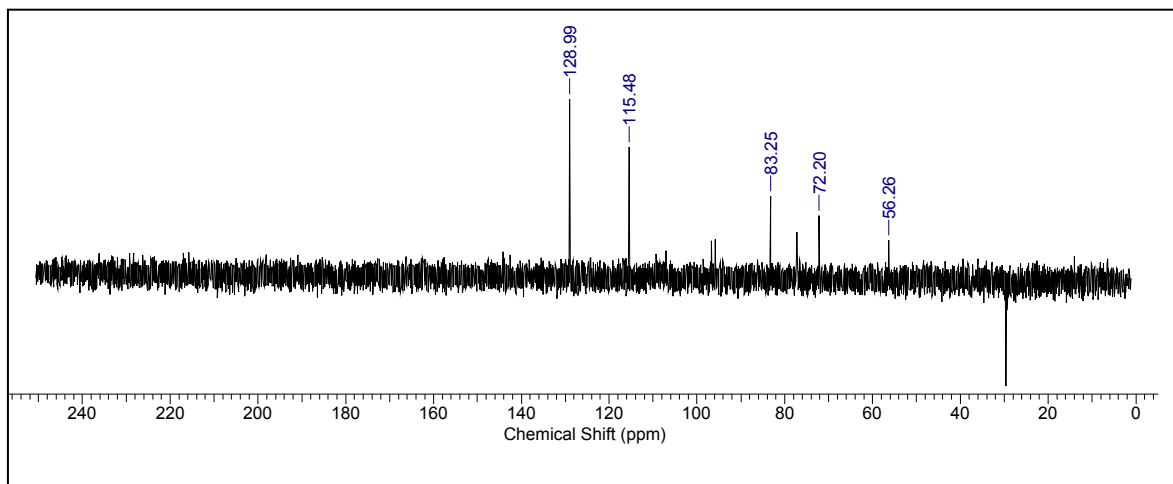


Figura 27 – Espectros de DEPT 135° (75 MHz, CDCl₃) da substância **2**.

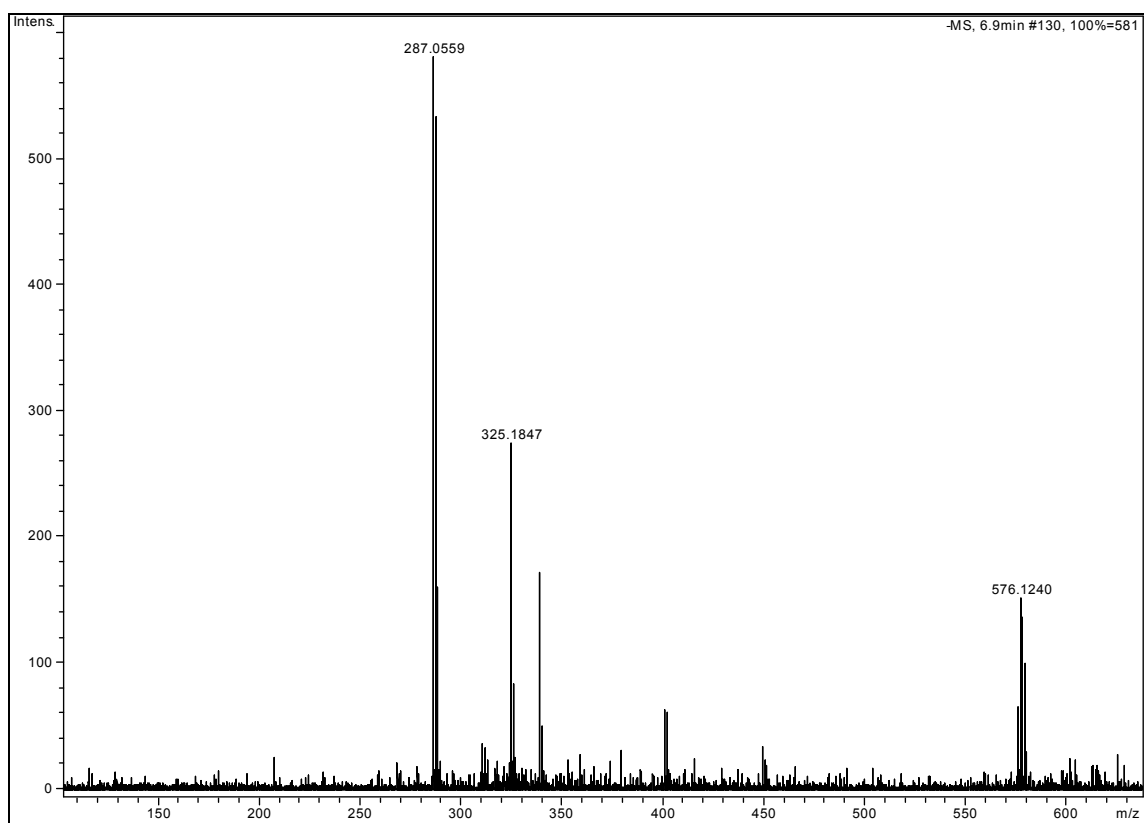


Figura 28 – Espectro de massas da substância **2** em modo de detecção negativo.

5.2.3 Substância 3

O composto **3** (17 mg) apresentou aspecto cristalino incolor e inodoro, pouco solúvel em clorofórmio, solúvel em metanol e ponto de fusão entre 250 e 253°C. A análise por CCD em cromatoplaça de sílica gel forneceu mancha única com Rf 0,8 após eluição com clorofórmio:ácido acético:metanol:água (64:32:12:08) e revelação com iodo ou NP/PEG (fluorescência azul).

O espectro de absorção na região do IV (KBr) apresentou banda larga e forte em 3371 cm⁻¹ e conjunto de absorções entre 1539–1616 e 1026-1265 cm⁻¹ referentes, respectivamente, as deformações axiais dos grupos hidroxila (O-H), C-C de aromático e carbinólico de fenol (Ar-C-O). O espectro também forneceu absorções intensas de estiramento carbinólico em maior frequência (1323 cm⁻¹) e de deformação axial de carbonila (1697 cm⁻¹) (Figura 30) (132, 133).

O conjunto de sinais e os deslocamentos químicos adquiridos por RMN ¹³C reforçam as informações obtidas por IV sobre a aromaticidade da substância **3** (sinais entre δ 109 e 167) substituída por uma carbonila (δ 167) (Figura 31). Os cinco sinais visualizados por RMN ¹³C associados a apenas um simpleto intenso em δ 7,14 e um sinal em DEPT 135° (δ 110), bem como a maior intensidade em δ 109,8 e 145,7 observadas por ¹³C, sugeriram uma simetria do anel aromático onde há apenas um tipo de carbono metínico e quatro tipos de carbonos não hidrogenados (Figuras 31-33) (132-134).

Os resultados espectrais associados ao comportamento por CCD, ponto de fusão e solubilidade, quando em comparação com amostra autêntica e dados da literatura, possibilitaram a identificação da substância **3** como sendo o ácido gálico (Tabela 7) (92, 135).

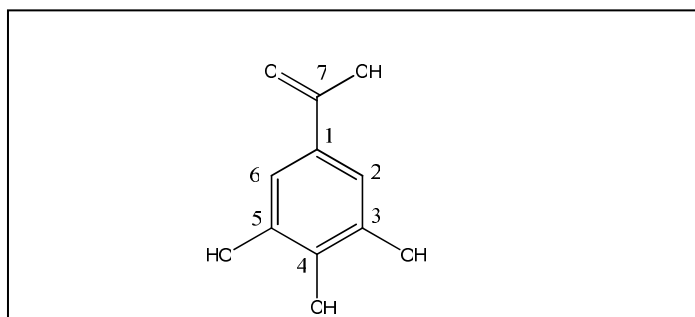


Figura 29 – Estrutura molecular da substância **3** (ácido gálico).

O ácido gálico já foi isolado de *C. vitifolium* e os seus ésteres (galatos de metila e de etila) foram identificados em *C. planchoni* parecendo ser, portanto, uma substância comum do gênero *Cochlospermum* (92, 89).

Vale comentar que este metabólito é considerado como marcador químico de drogas vegetais e bebidas (vinhos, frutas, sucos) em análises de controle de qualidade (136 -138).

Tabela 7 – Comparação entre os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) da substância **3** e dados da literatura para o ácido gálico

C	Substância 3*		Ácido gálico** (92)	
	δ ^1H δ (M)	^{13}C δ	δ ^1H δ (M)	^{13}C δ
1	-	121,7	-	120,7
2,6	7,11 (s)	109,8	7,08 (s)	109,1
3,5	-	145,7	-	145,1
4	-	138,3	-	138,3
7	-	167,5	-	169,1

*TMS δ 0; $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$; ^1H 300 MHz; ^{13}C 75 MHz.

**TMS δ 0; CD_3OD ; ^1H 300 MHz; ^{13}C 75 MHz.

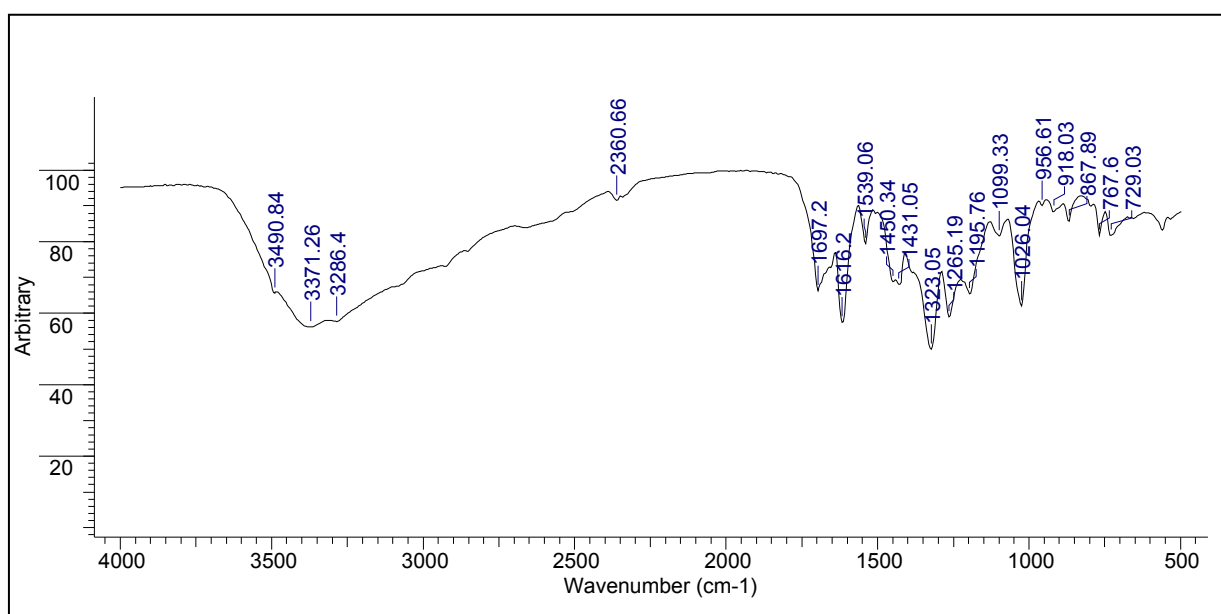


Figura 30 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) da substância **3**.

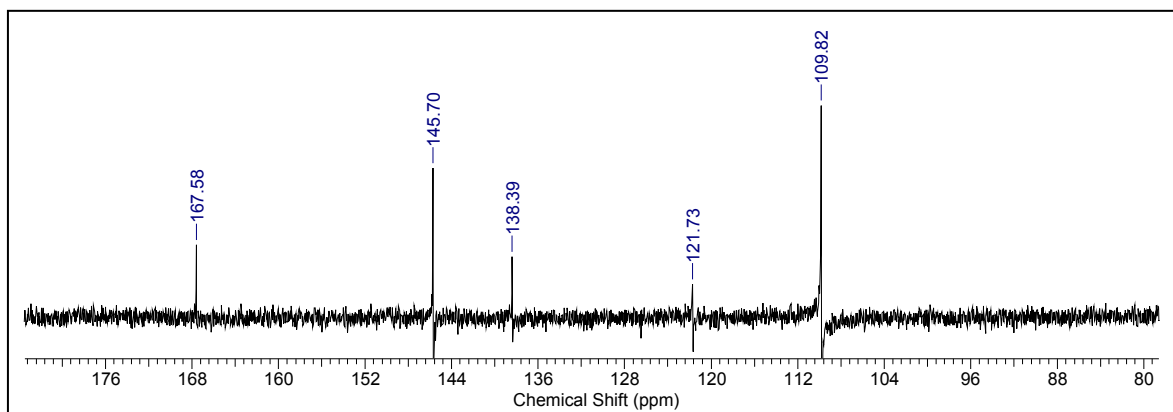


Figura 31 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) da substância **3**.

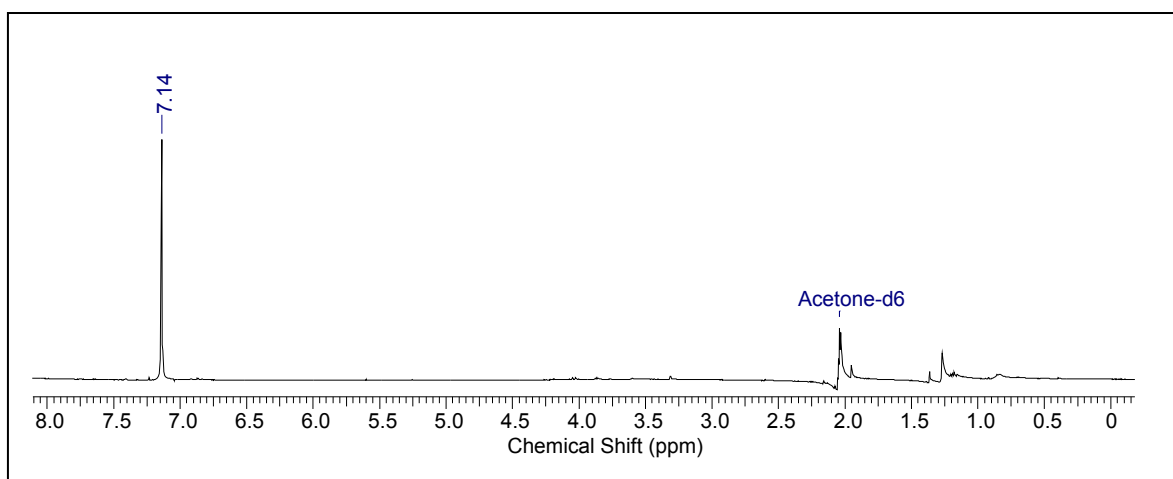


Figura 32 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) da substância **3**.

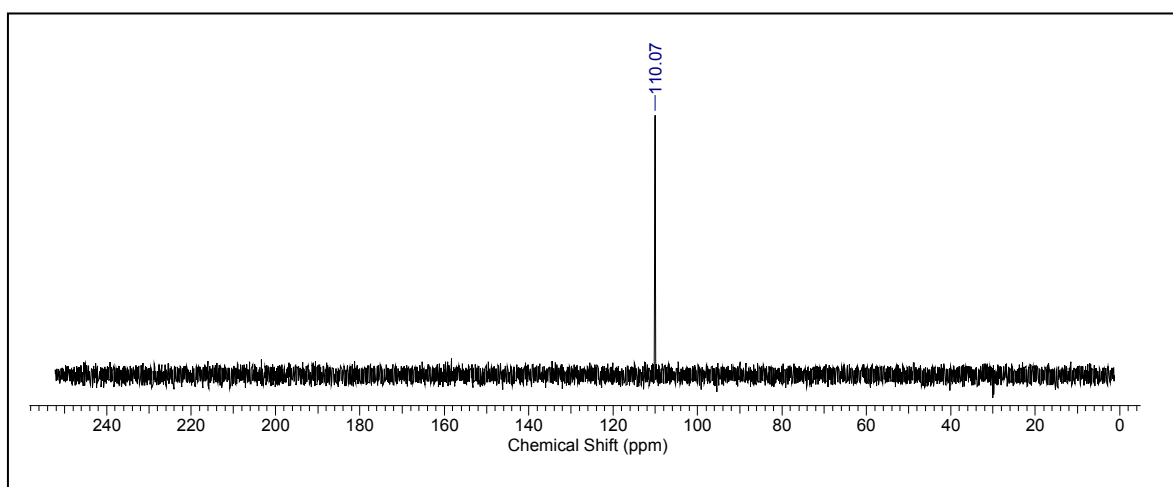


Figura 33 – Espectro de DEPT 135° (75 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) da substância **3**.

5.2.4 Substância 4

A substância **4** foi obtida (15 mg) após fracionamento do extrato acetato de etila em coluna empacotada com sílica e eluída com misturas de clorofórmio:metanol com gradiente crescente de polaridade (Figura 18). Apresentou-se como cristal incolor, inodoro, pouco solúvel em acetato de etila e solúvel em metanol e acetona. Em CCD realizada com cromatoplaça de sílica gel apresentou fator de retenção 0,8 após eluição com clorofórmio:ácido acético:metanol:água (64:32:12:8) e revelação com iodo sublimável ou cloreto férrico 5% (cor azul).

A proposta estrutural foi obtida pelo conjunto de informações fornecido por EM e RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135°, gHMBC e gHMQC, comparados com dados da literatura (139, 140).

O espectro de massas foi obtido empregando ionização *electrospray* no modo de ionização negativo que forneceu o pico do íon molecular desprotonado em m/z 197,0460 relativo à fórmula $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_5^-$, e os fragmentos m/z 169 $[\text{M}-\text{CH}_2\text{CH}_3]^-$ e m/z 124 $[\text{M}-\text{CH}_2\text{CH}_3-\text{CO}_2]^-$ (Figura 35) (132, 133).

Os sinais adquiridos por RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135° são semelhantes aos já apresentados para a substância **3** (ácido gálico) havendo, entretanto, sinais em campo mais alto relacionados com a presença de carbono metilênico carbinólico e metila característicos de etila de etóxido (Figuras 36-38) (132, 133).

Por RMN ^1H observou-se simpleto intenso na região de hidrogênios aromáticos (δ 7,05, 2H), quarteto na região de hidrogênios de metileno carbinólico (δ 4,27, 2H, $J= 7,12$ Hz) e tripleto em campo alto relacionado a presença de metila (δ 1,34, 3H, $J= 7,12$ Hz). O espectro de ^{13}C associado à DEPT 135°, sugerem a presença de uma carbonila (δ 168,5), carbonos quaternários aromáticos (δ 139,7 e 146,4), carbonos metínicos aromáticos (δ 108,1), um carbono metilênico carbinólico (δ 61,6) e um grupo metila (δ 14,6) (Figuras 36-38) (132, 133). Os sinais de maior intensidade em δ 110,0 e 146,5 reforçam a simetria do anel aromático semelhante ao que foi discutido para a substância **3** (ácido gálico).

O acoplamento direto heteronuclear entre ^1H e ^{13}C (gHSQC) mostrou correlações entre os sinais de carbono observados em δ 110,0 (C2 e C6), 61,7 (C8) e 14,62 (C9) com os sinais de hidrogênio em δ 7,05 (2H, s, H2 e H6), δ 4,27 (2H, q, $J= 7$ Hz, H8) e δ 1,34 (3H, t, $J= 7$ Hz, H9), respectivamente (Figura 39). Já as

correlações entre C8 x H9 e C9 x H8 observadas no mapa de contornos de *g*HMBC reforçam a presença de grupo etila caracterizada por RMN ^1H e ^{13}C (Figura 40) (132, 133).

Todos os dados fornecidos, comparados com dados da literatura, sugerem sobre a identidade da substância **4** como o galato de etila (Tabela 8) (139, 140).

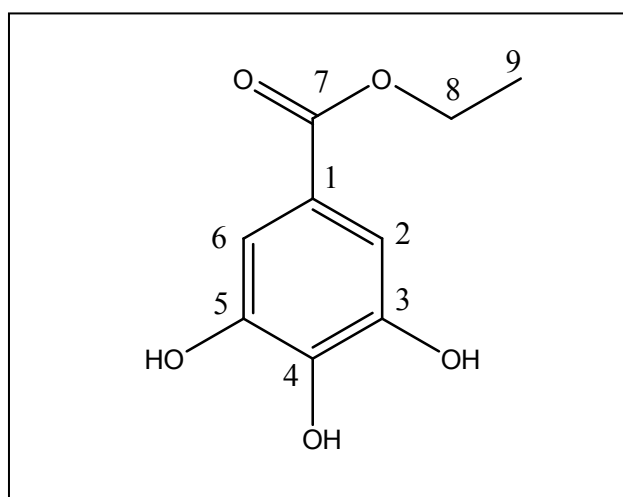


Figura 34 – Estrutura molecular da substância **4** (galato de etila).

Abad *et al.* (141) e Ceruks *et al.* (140) afirmaram que o uso do metanol ou etanol como solvente, em função da temperatura em que são utilizados, pode provocar acetilação ou transcetilação de aldeídos ou a esterificação parcial ou completa de ácidos possibilitando a formação de ésteres do ácido gálico em extratos vegetais. Neste sentido, foi verificada a possibilidade de **4** ser um artefato produzido pela extração hidroetanólica da raiz de *C. regium*, através da análise qualitativa por CLAE com o extrato bruto metanólico. A ausência de galato de etila (**4**) ($\text{Tr} = 3,1$ min) observada pelo experimento sugere que este composto não é de ocorrência natural nesta espécie (Figura 41).

Ceruks *et al.* (140) também informaram que os galatos de metila e de etila apresentam atividade anti-radical sobre o DPPH, descolorando-o em cromatoplaças nebulizadas com solução metanólica de 2 mg/ mL.

Tabela 8 – Comparação entre os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) da substância **4** e dados da literatura para galato de etila, e correlação direta heteronuclear entre ^1H e ^{13}C (gHSQC)

Posição	Tipo de C	Substância 4*		Galato de etila** (140)		gHMBC
		^1H δ (M, J em Hz)	^{13}C δ	^1H δ (M, J em Hz)	^{13}C δ	
1	C	-	121,7	-	119,6	H2, H6
2	CH	7,05 (s)	110,0	6,92 (s)	108,5	H6
3	C	-	146,5	-	145,6	H2
4	C	-	139,7	-	138,6	
5	C	-	146,5	-	145,6	H6
6	CH	7,05 (s)	110,0	6,92 (s)	108,5	H2
7	C	-	168,6	-	165,9	H2, H6, H8
8	CH ₂	4,27 (q, 7,0)	61,7	4,18 (q, 7,2)	60,0	H9
9	CH ₃	1,34 (t, 7,0)	14,6	1,25 (t, 7,2)	14,3	H8

*TMS δ 0; CD₃OD; ^1H 200 MHz; ^{13}C 50,3 MHz.

**TMS δ 0; DMSO-*d*₆; ^1H 200 MHz; ^{13}C 50,3 MHz.

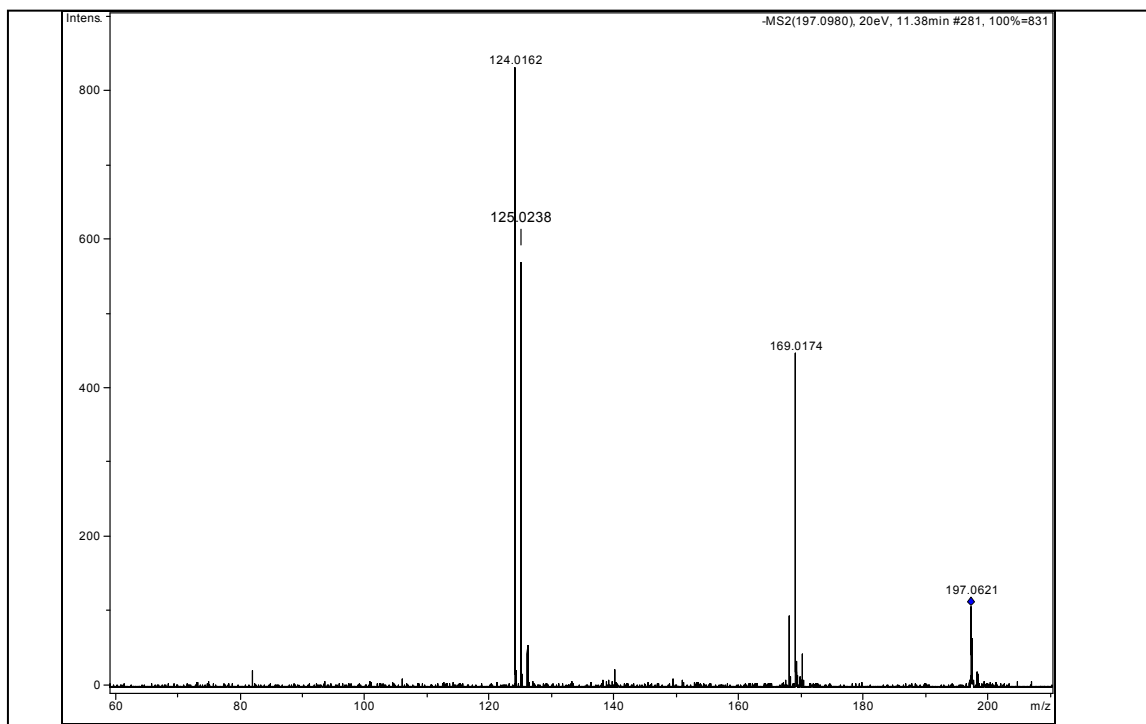


Figura 35 – Espectro de massas da substância **4** no modo de ionização negativo.

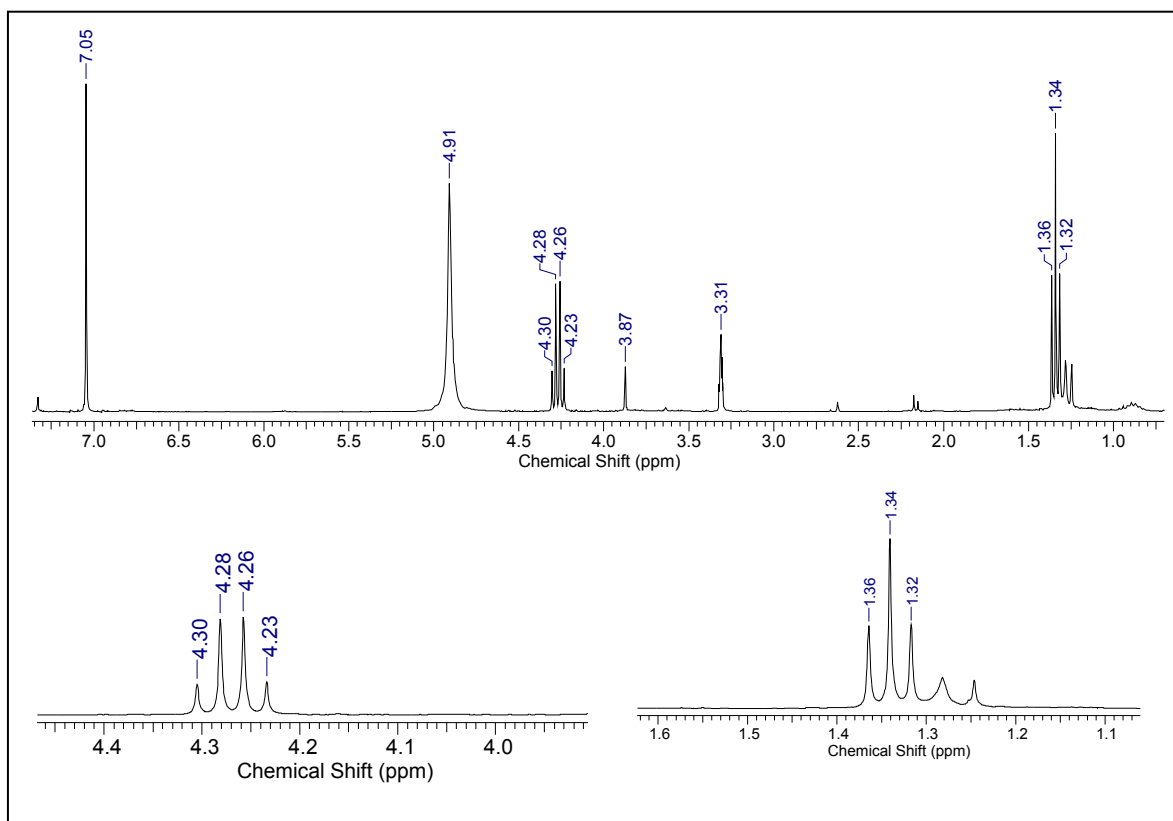


Figura 36 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) da substância **4** com expansões das regiões entre δ 4,0 - 4,4 e δ 1,1-1,6.

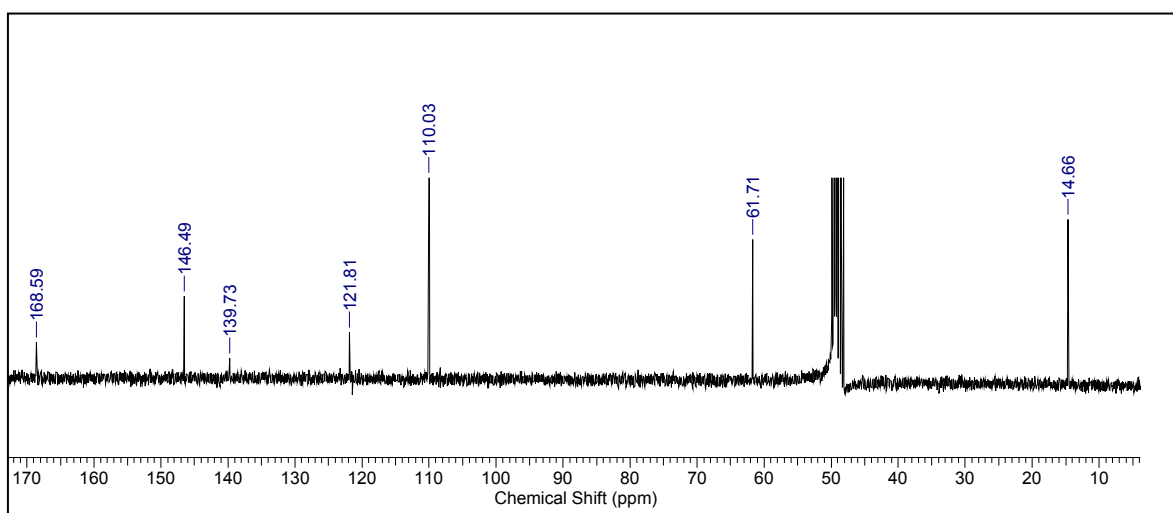


Figura 37 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) da substância **4**.

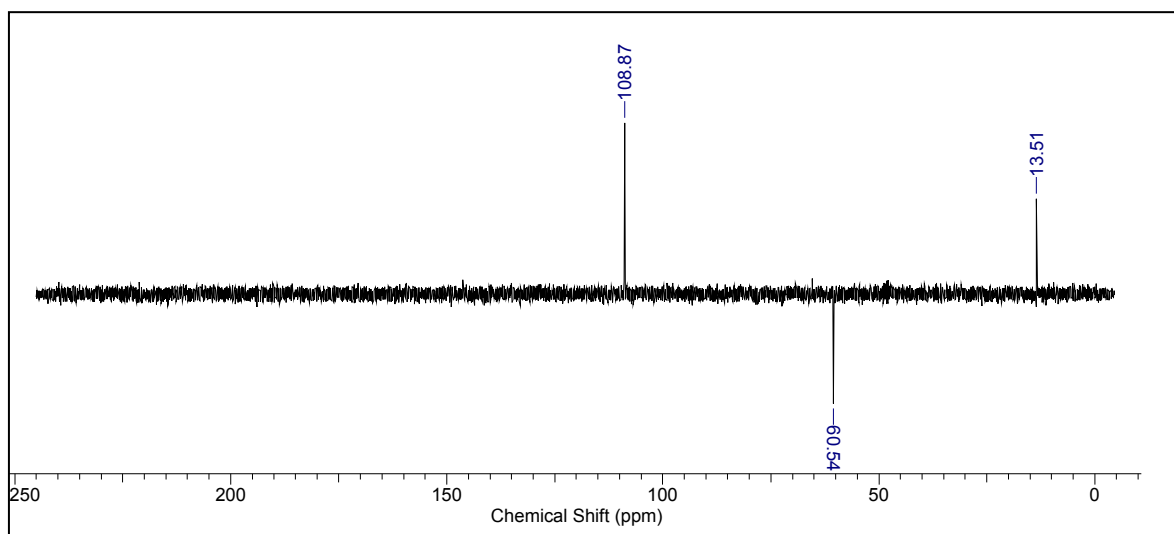


Figura 38 - Espectro de DEPT 135° (75 MHz, CD₃OD) da substância **4**.

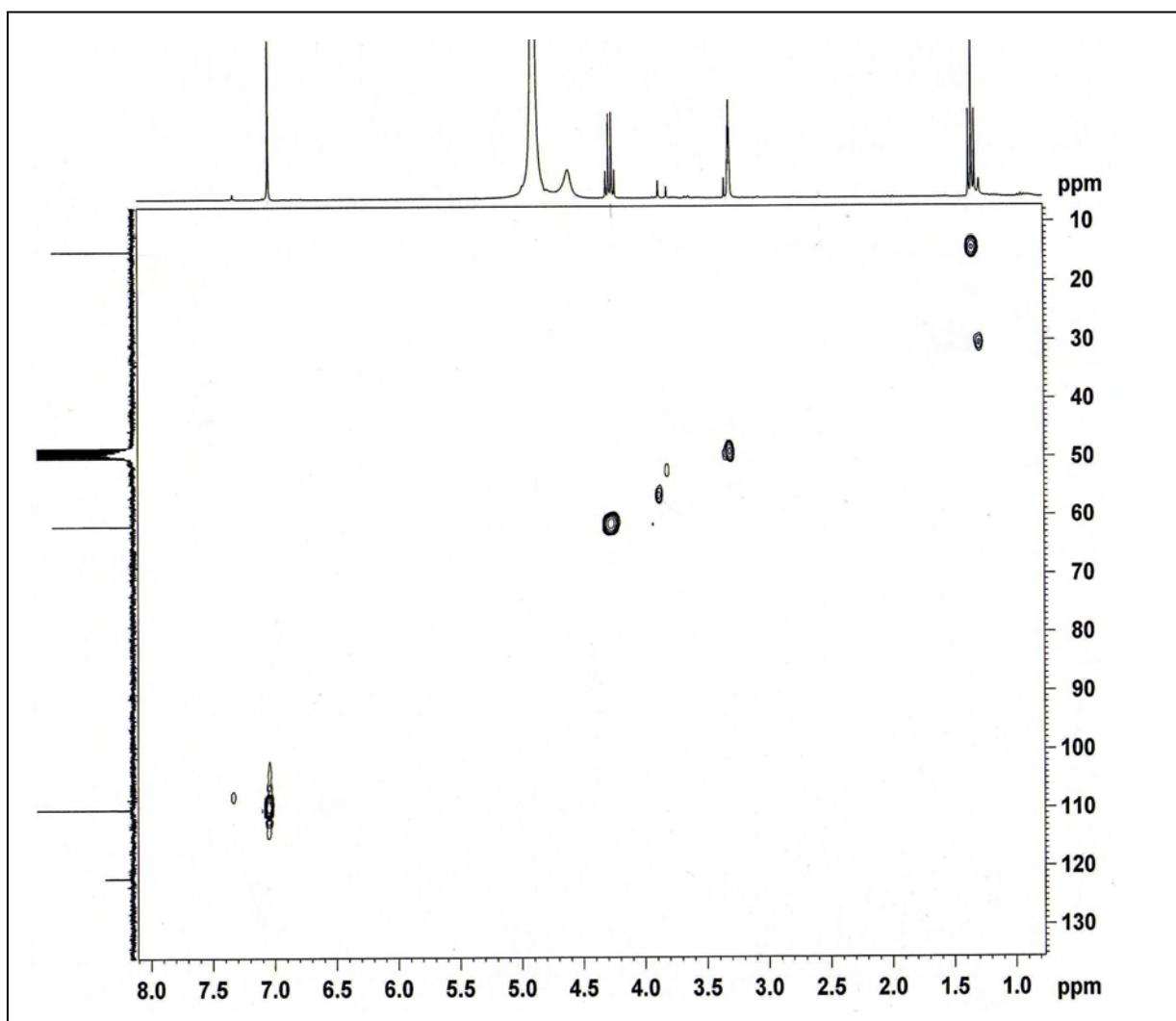


Figura 39 - Mapa de contornos de gHSQC (300 MHz/ 75 MHz, CD₃OD) da substância 4.

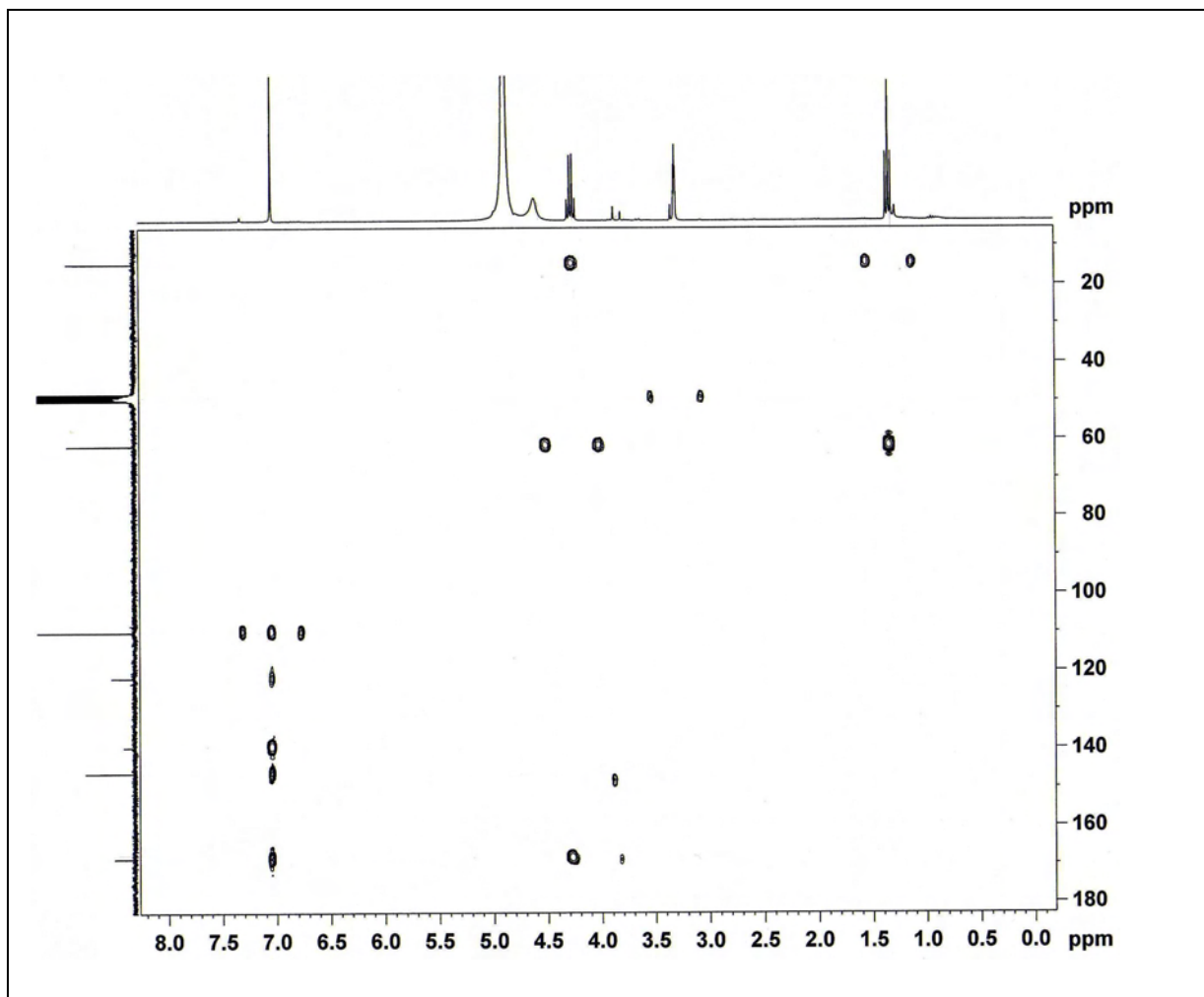


Figura 40 – Mapa de contornos gHMBC (300 MHz/ 75 MHz, CD₃OD) da substância **4**.

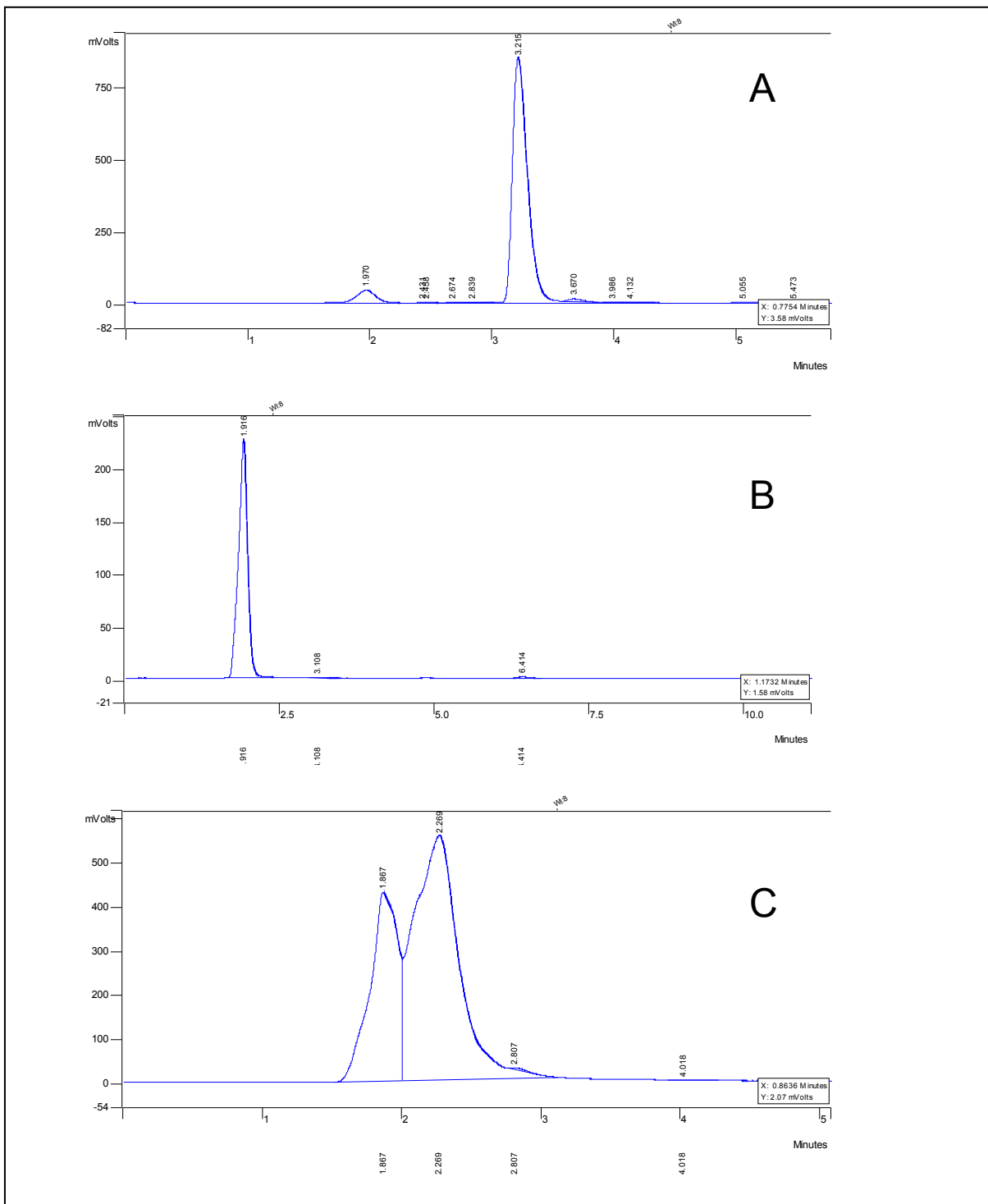


Figura 41 – Cromatogramas por CLAE-UV/Vis empregando coluna C-18, mistura de acetonitrila:água (1:1), fluxo de 1 mL/ min. e detecção em 270 nm. (A) galato de etila; (B) ácido gálico; (C) extrato metanólico da raiz de *C. regium*.

5.2.5 Substância 5

O composto **5** (23 mg) foi caracterizado como um precipitado amorfo amarelo claro, inodoro, muito solúvel em metanol e solúvel em acetona, obtido (15 mg) do extrato acetato de etila após fracionamento em coluna cromatográfica empacotada com sílica gel e eluída com clorofórmio:metanol em gradiente crescente de polaridade (Figura 18).

As melhores condições para o deslocamento da substância **5** em cromatoplaças de sílica foram obtidas empregando eluentes polares úteis para o deslocamento de substâncias fenólicas. Neste sentido, foram determinados pelos R_f 0,6 e 0,5 após eluição com clorofórmio:ácido acético:metanol:água (64:32:12:08) e acetato de etila:metanol:água (100:13:10), respectivamente. A substância apresentou intensa fluorescência amarela pós nebulização de NP/PEG seguido de incidência de luz ultravioleta (366 nm).

O espectro de absorção na região do IV (KBr) (Figura 43) sugeriu a presença de hidroxila, anel aromático, carbonila conjugada e grupo carbinólico devido as bandas características de deformações axiais de O-H (3386 cm^{-1}), C=C de aromáticos (1639 e 1515 cm^{-1}), C=O (1697 cm^{-1}) e C-O (1284 cm^{-1}) (132, 133).

Pelo espectro de massas utilizando ionização por *electrospray* no modo de ionização negativo, foi obtido o íon desprotonado em m/z 449,1120 compatível com a fórmula molecular de $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}^-$ [M-H] (Figura 44).

Todos os dados espectrais obtidos por RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135° e *gHSQC* sugeriram que a amostra analisada constitui-se majoritariamente por um flavanonol monoglicosilado com estreita similaridade com a substância **2** (Figuras 45-49) (132-134).

O padrão de substituição dos anéis A e B são semelhantes ao da substância **2** onde o anel A possui grupos hidroxila em C5 e C7 e o anel B é substituído em posição *para*. Com relação ao anel A, tais afirmações são atribuídas aos sinais dos carbonos metínicos C6 e C8 em δ 96,4 e 97,4 relacionados com os sinais os hidrogênios em δ 5,89 (d, $J= 1,99$) e 5,91 (d, $J= 1,99$). Já o anel B 1,4 dissubstituído é apontado por H2'-H6' e H3'- H5' que, respectivamente, são observados como dupletos em δ 7,36 ($J= 8,5\text{ Hz}$, 2H) e δ 6,81 ($J= 8,5\text{ Hz}$, 2H), associados aos sinais intensos em δ 130,5 e 116,3, no espectro de ^{13}C (Figuras 45-49). Os acoplamentos

diretos entre os carbonos dos anéis A e B com seus respectivos hidrogênios foram caracterizados pelo mapa de contornos gHSQC (Figuras 45-49) (132-134).

A natureza do anel C também pôde ser sugerida devido aos dupletos de H2 e H3 em δ 4,97 e 5,26 (1H, J = 10,2 Hz) compatíveis com a funcionalização de um flavanonol, não havendo ligação olefínica entre C-2 e C-3 (Figura 45-49). Por ^{13}C , o deslocamento da carbonila em δ 196,1 associado aos sinais de carbonos oximetínicos em δ 83,6 (CH, C-2) e δ 78,2 (CH, C-3) confirmaram a ausência de carbonos olefínicos no anel C reforçando a proposta de um flavonol caracterizado pela análise espectral de ^1H . Por gHSQC, estes sinais mostram acoplamento entre os dupletos em δ 4,97 e 5,26 confirmando a correlação direta entre C2 x H2 e C3 x H3 (Figuras 50 e 51) (132-134).

O sinal em δ 62,6 atribuído ao carbono metilênico C6'' e o conjunto de sinais δ 102,6 (C1''), 77,6 (C5''), 77,2 (C3''), 74,6 (C2'') e 71,2 (C4'') caracterizaram a unidade monosíca como sendo o açúcar D-glicopiranosose (Tabela 9). O espectro de RMN ^1H apresentou duplete em δ 3,80 atribuído ao hidrogênio anomérico (H1''), cuja constante de acoplamento de 7,69 Hz indicou a configuração β para a unidade de glicose. Pelo mapa de contornos gHMBC foi possível determinar o local de inserção do grupo glicosila à unidade flavônica pelas correlações entre os sinais δ 4,97 (H3) e δ 102,6 (C1''), bem como com as correlações entre δ 3,80 (H1'') e δ 78,2 (C3) (Figura 52). A análise espectral por RMN ^1H permitiu ainda sugerir a relação *anti* entre o grupo glicosila e o anel B pelo acoplamento axial-axial observado pela constante de acoplamento (J) de 10,2 Hz entre os dupletos em δ 5,2 e 4,9 de H2 e H3 (Figura 47) (AGRAWAL, 1992; REGASINI et al., 2008).

Os resultados espectrais associados ao comportamento por CCD e solubilidade, quando em comparação com amostra autêntica e dados da literatura, bem como as correlações observadas por gHSQC e gHMBC, possibilitaram reconhecer a substância **5** como o diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo (aromadendrina 3-O- β -glucopiranosídeo) (Figura 42) (67, 139, 144).

É importante ressaltar que os deslocamentos atribuídos para C3 (δ 77,2) diferiu do citado por Baderschneider e Witerhalter (139), conforme apresentado na Tabela 9 (C3 – δ 78,2). A identificação destes sinais se mostra inequívoca para **5** mediante a interpretação dos espectros heteronucleares gHSQC e gHMBC (Figuras 50-52).

A Tabela 9 relaciona os valores dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C com dados da literatura referentes a este composto.

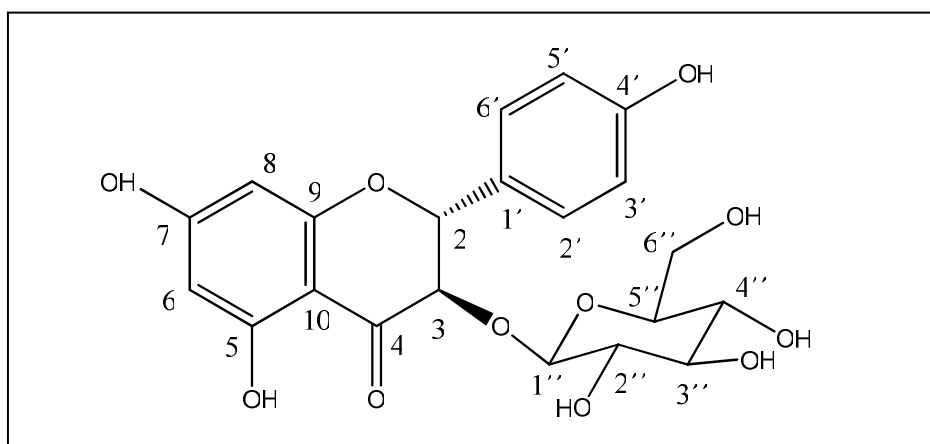


Figura 42 – Estrutura molecular de **5** (dihidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo).

Tabela 9 – Comparação entre os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) da substância **5** e dados da literatura para o diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo

Posição	Tipo de C	Substância 5*		Aromadendrina 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	5,26 (d, 10,2)	83,6	5,26 (d, 10,0)	83,5
3	CH	4,97 (d, 10,1)	77,2	4,95 (d, 10,0)	78,2
4	C	-	196,1	-	195,5
5	C	-	164,2	-	165,6
6	CH	5,89 (d, 2,0)	96,4	5,91 (d, 2,0)	96,9
7	C	-	169,1	-	170,9
8	CH	5,91 (d, 2,0)	97,4	5,89 (d, 2,0)	96,9
9	C	-	165,5	-	164,2
10	C	-	102,6	-	102,6
1'	C	-	128,5	-	128,7
2'	CH	7,36 (d, 8,5)	130,5	7,36 (m)	130,4
3'	CH	6,81 (d, 8,5)	116,3	6,81(m)	116,2
4'	C	-	159,3	-	159,3
5'	CH	6,81 (d, 8,5)	116,3	6,81(m)	116,2
6'	CH	7,36 (d, 8,5)	130,5	7,36(m)	130,4
1''	CH	3,80 (d, 7,7)	102,6	3,82 (d, 8,0)	102,6
2''	CH		74,6		74,6
3''	CH		77,6		77,2
4''	CH	2,95-3,30 (m)	71,2	2,98 – 3,2 (m)	71,2
5''	CH		78,2		77,6
6''a	CH ₂	3,60 (dd, 5,7)	62,6	3,59 (dd, 5,5)	62,6
6''b		3,73 (d, 2,1)		3,75 (dd, 2,5)	

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

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

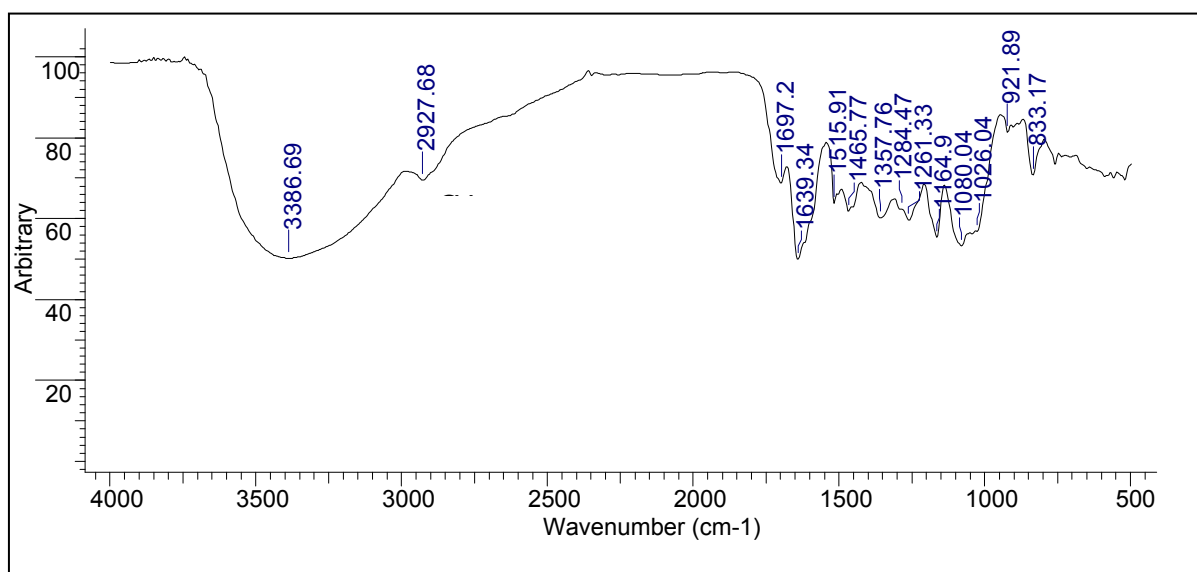


Figura 43 – Espectro de absorção na região do Infravermelho (KBr) da substância **5**.

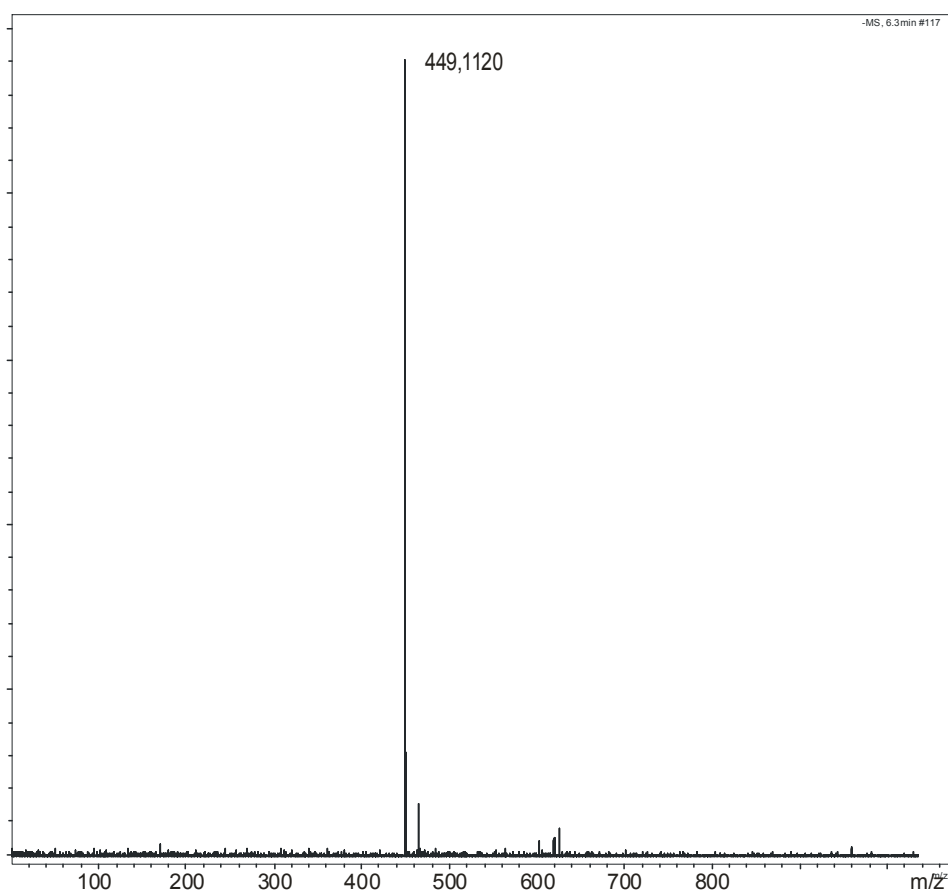


Figura 44 – Espectro de massas da substância **5** em modo de ionização negativo.

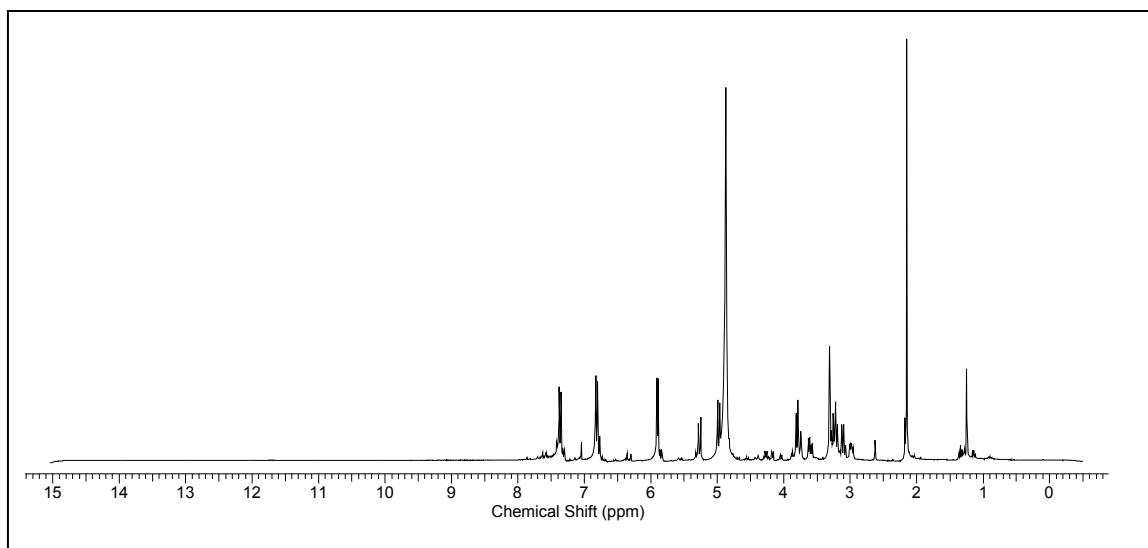


Figura 45 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) da substância **5**.

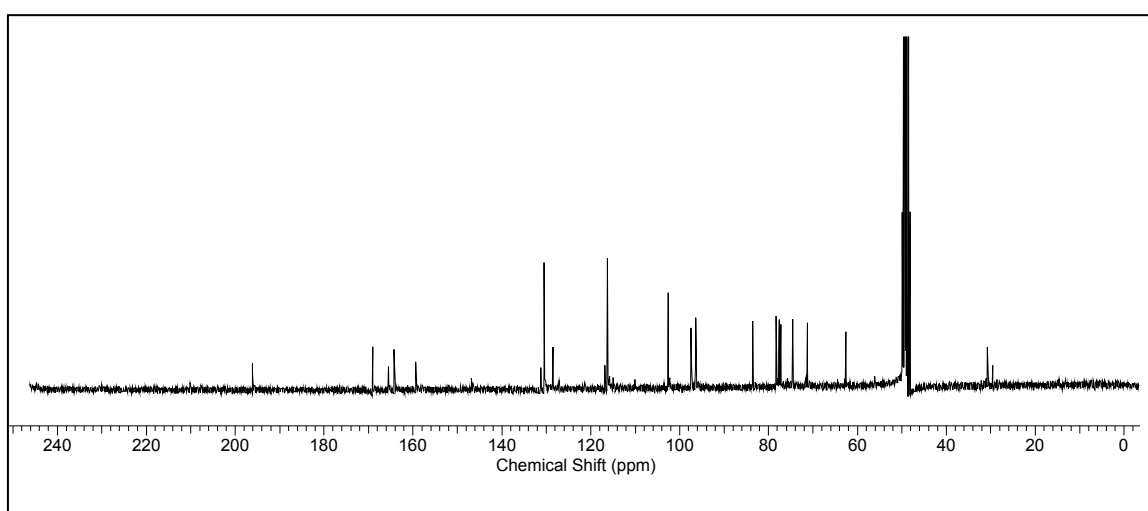


Figura 46 – Espectro de RMN ¹³C (300 MHz, CD₃OD) da substância **5**.

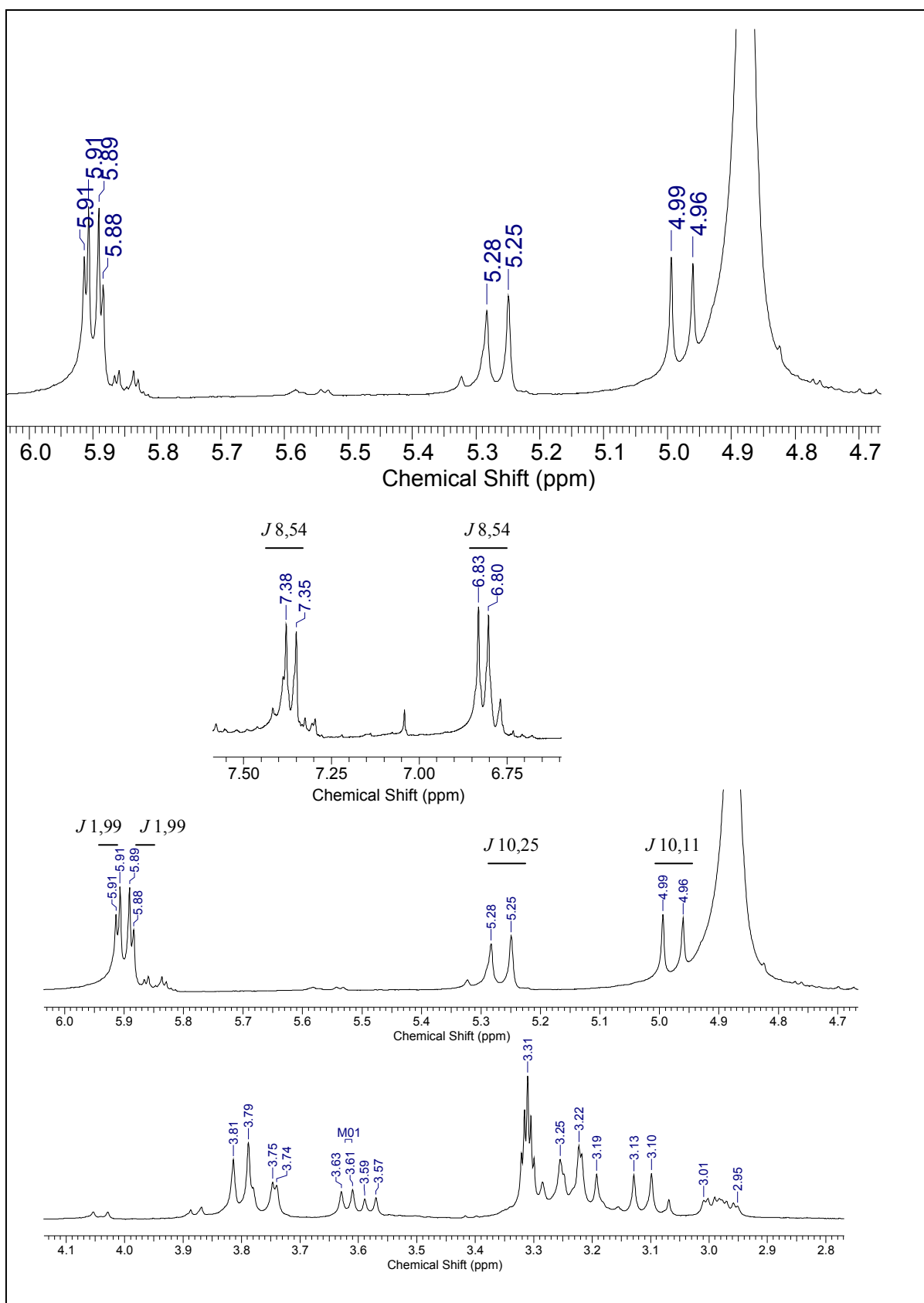


Figura 47 – Expansões do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) da substância **5**, nas regiões entre δ 2,0–8,0; 6,5–7,7; 4,6–6,0 e 2,8–4,2.

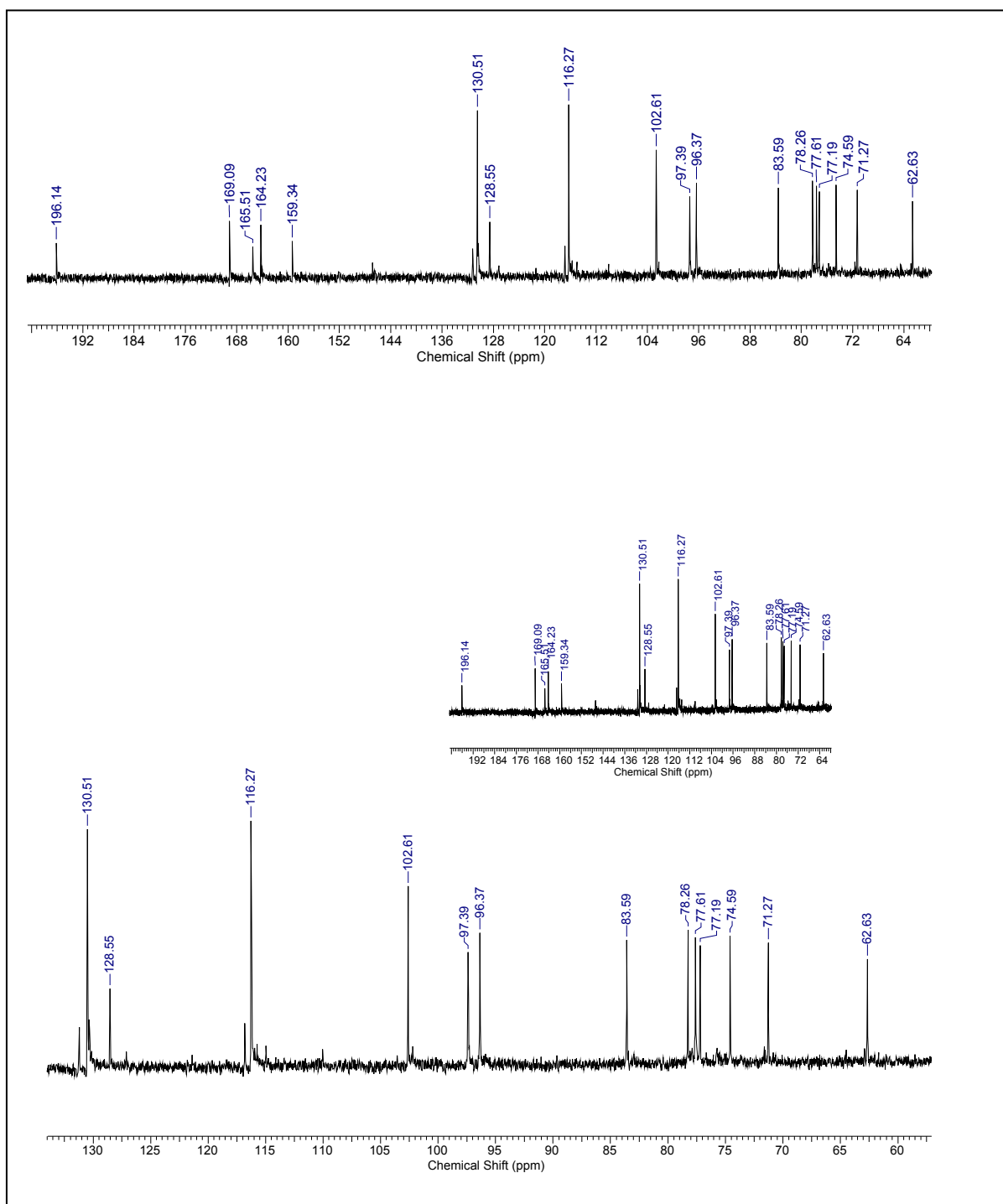


Figura 48 – Expansões do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) da substância **5**, nas regiões entre δ 60-195, 140-195 e 55-140.

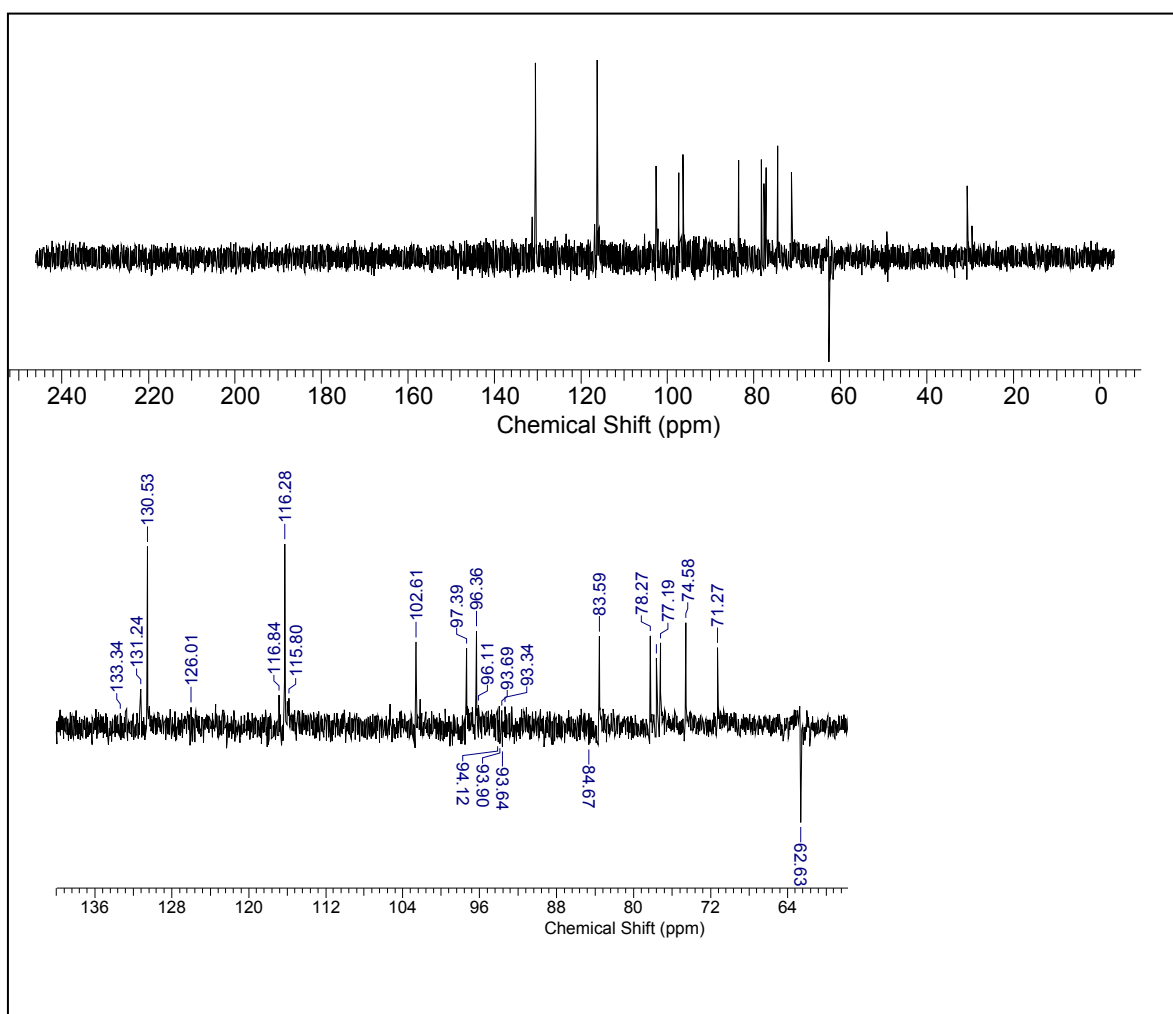


Figura 49 – Espectro de DEPT 135° (75 MHz, CD₃OD) da substância **5** e ampliação na região entre δ 60 e 140.

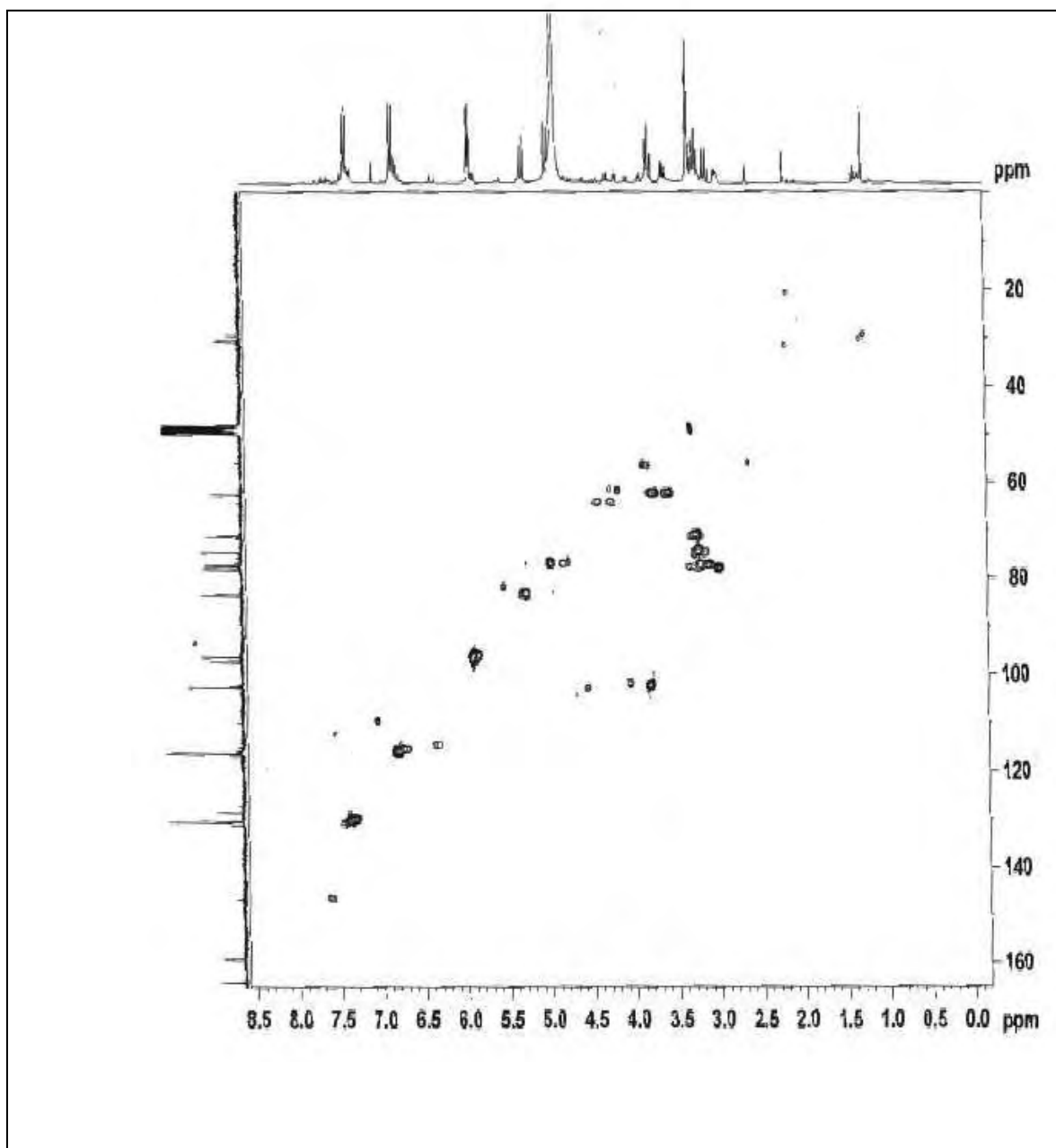


Figura 50 – Espectro de gHSQC (300 MHz/75 MHz, CD₃OD) da substância **5**.

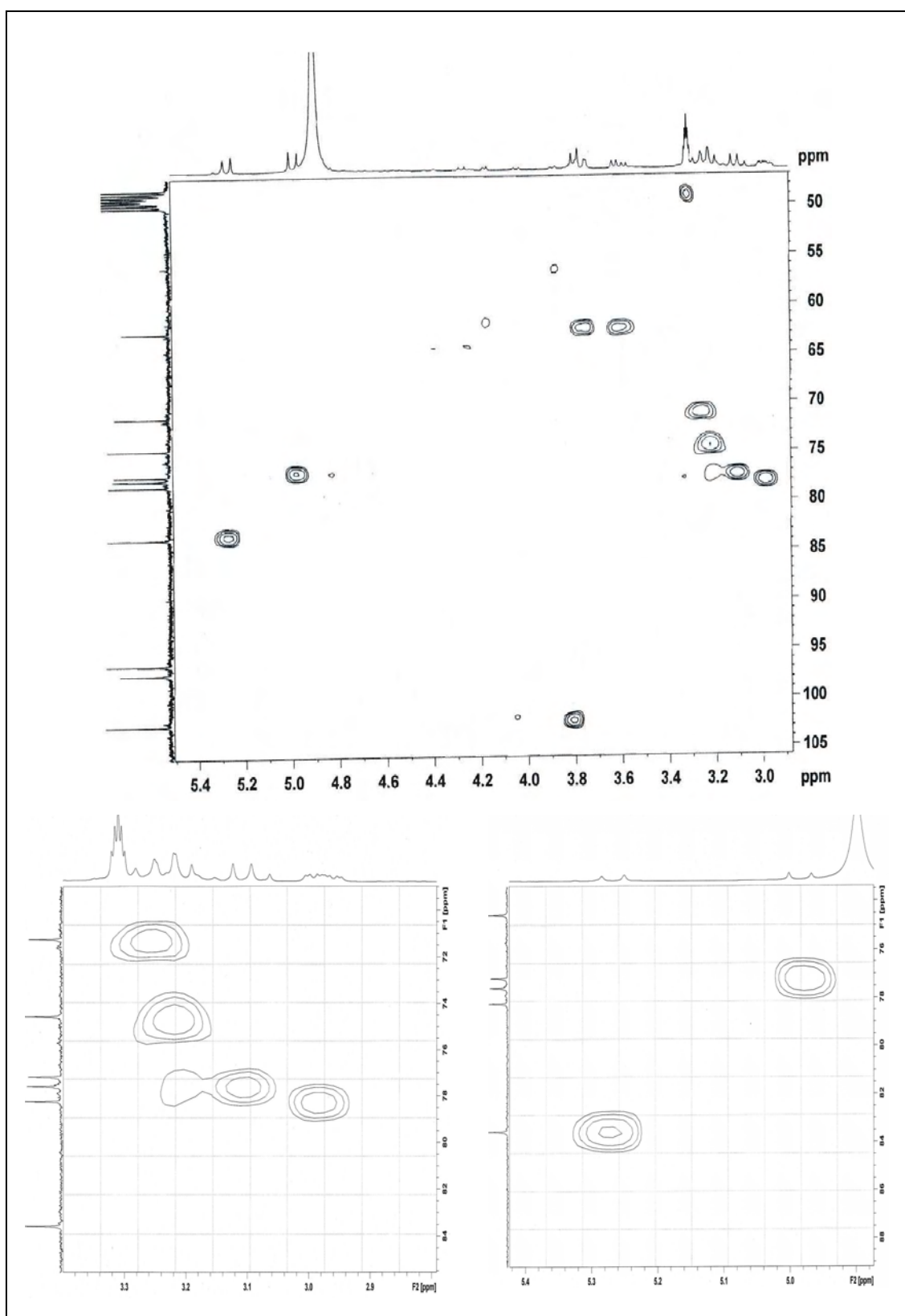


Figura 51 – Ampliações do espectro de gHSQC (300 MHz/75 MHz, CD₃OD) da substância **5**, nas regiões entre δ 2,8-5,4 x 45-105; 2,8-4,0 x 70-85 e 4,5-5,5 x 74-89.

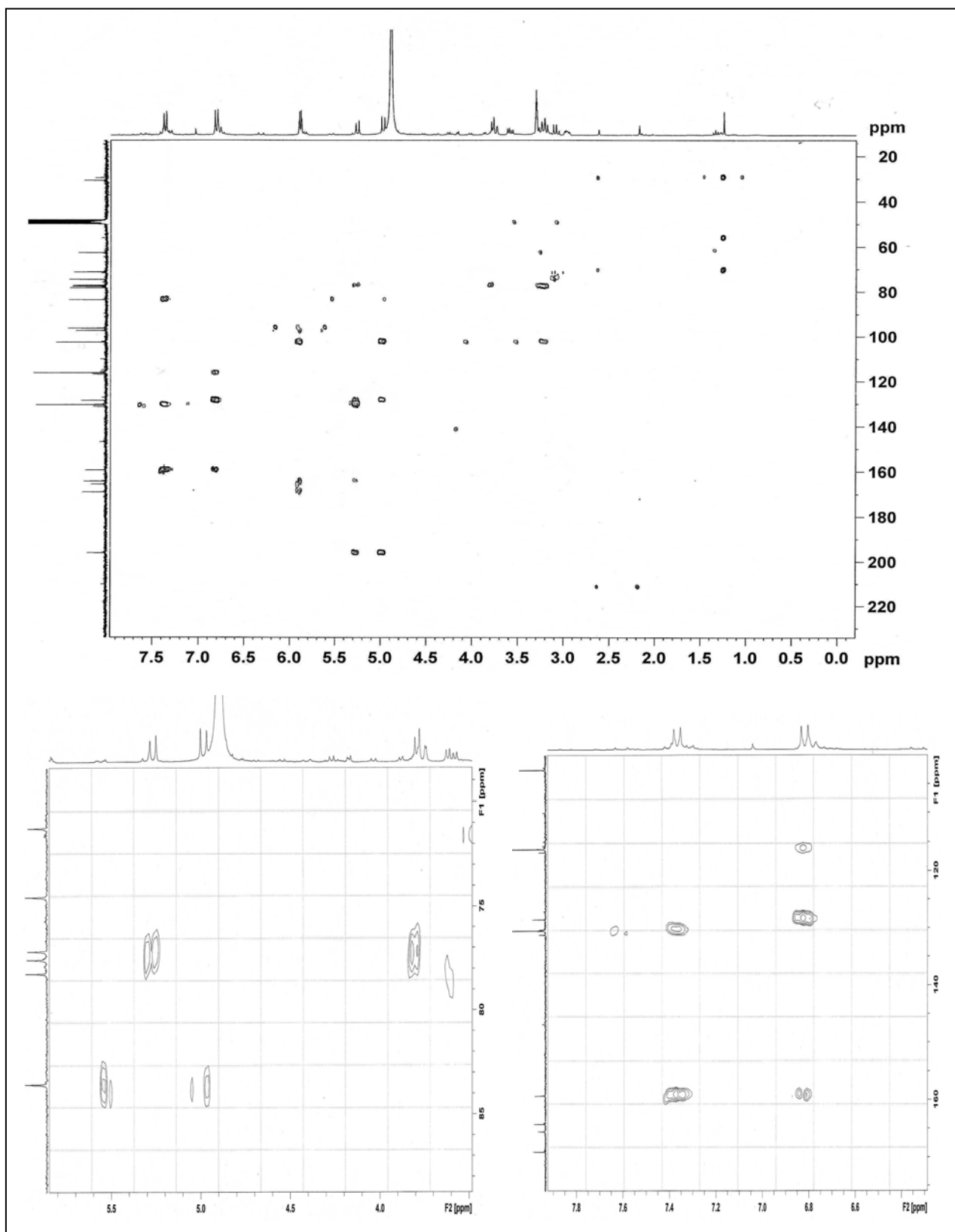


Figura 52 – Espectro de gHMBC (300 MHz/75 MHz, CD_3OD) da substância **5** e ampliações as regiões entre δ 3,5-6,0 x 70-90 e 6,3-8,0 x 100-180.