

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ANÁPOLIS

Constituintes Químicos de *Cochlospermum regium* (Martius e Schrank) Pilger (Bixaceae)

Marlene Neves Antunes

Goiânia – GO
2009

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ANÁPOLIS

Constituintes químico de *Cochlospermum regium* (Martius e Schrank) Pilger (Bixaceae)

Marlene Neves Antunes

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica**, oferecido numa associação entre a Universidade Católica de Goiás, a Universidade Estadual de Goiás e o Centro Universitário de Anápolis, para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra. Caridad Noda Pérez
Co-orientador: Prof. Antônio Carlos Severo Menezes

Goiânia – GO
2009

A636c Antunes, Marlene Neves.
Constituintes químicos de *Cochlospermum regium*
(Martius e Schrank) Pilger (Bixaceae) / Marlene Neves
Antunes. – 2009.
89 f. : Il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Goiás,
Universidade Estadual de Goiás, Centro Universitário de
Anápolis, 2009.

“Orientadora: Dra. Caridad Noda Pérez”.

“Co-orientador: Prof. Antônio Carlos Severo Menezes”.

1. *Cochlospermum regium*– constituintes químicos. 2.
Excelsina. 3. Naringenina. 4. Flavanona. 5. Ácido p-
hidroxicinâmico estereato. 5. Fitoterapia. 6. Algodãozinho-do-
campo. I. Título.

CDU: 615.89(043.3)



UNIVERSIDADE
Católica
DE GOIÁS

PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1071 • Fax: (62) 3946.1073
www.ucg.br • prope@ucg.br

DISSERTAÇÃO DO MESTRADO PROFISSIONAL EM GESTÃO,
PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM TECNOLOGIA
FARMACÊUTICA

DEFENDIDA PELA MESTRANDA **MARLENE NEVES ANTUNES**,
EM 05 DE NOVEMBRO DE 2009, CONSIDERADA
APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA.

1) Dra. Caridad Noda Pérez/UEG (Presidente) _____

2) Dr. Antônio Carlos Severo Menezes /UEG (Membro Interno) _____

3) Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves / UEG (Membro Externo) _____

“A simplicidade é o último degrau da sabedoria”.

Khalil Gibran

Dedicatória

*À minha mãezinha querida... (in memoriam),
um anjo amoroso que sempre acreditou em mim e foi a força maior
para que eu vencesse todos os meus desafios*

*A você, meu anjo querido, eu dedico este trabalho
Na esfera de vida que estiver receba a minha gratidão e todo o meu
AMOR*

*Dedico também a você **meu amado paizinho** (in memoriam), que com
sua presença de luz, iluminou tantas vezes meu caminho incerto...*

Dedico

À minha família,

*Ao meu esposo **Paulo** pelo amor, carinho e
dedicação ao longo de toda nossa convivência.
Obrigada pelo incentivo e compreensão em meus
momentos de ausência.*

*Ao meu filho **Lucas**, pela alegria de ser sua mãe...*

AO VÓS.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a **Deus**, pela oportunidade da vida. **Sua** infinita bondade me dá sempre forças e esperança nos momentos mais difíceis da minha caminhada...

À **Prof^a. Dr^a. Caridad Noda Perez**, por todo apoio, atenção e orientação neste trabalho. Seu profissionalismo, competência, dedicação, simplicidade, mas acima de tudo, seus valores humanos, fazem-na um exemplo a ser seguido.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes**, exemplo de seriedade, competência e dedicação. Sua atenção, disponibilidade e ensinamentos permitiram a concretização desse trabalho. Minha gratidão por sua co-orientação.

Ao **Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves** por aceitar o convite de participar de minha banca examinadora, suas contribuições e sugestões construtivas certamente melhorarão a qualidade deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Luciano Lião** do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás pela obtenção dos Espectros de RMN.

À **Prof^a. Dr^a Miriam Cristina Leandro Dorta** do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, pela disponibilidade, ensinamentos, apoio e amizade.

À **Prof^a. Dr^a. Mirley Luciene Santos**, do Herbário da Universidade Estadual de Goiás – UEG, pela identificação e depósito da exsicata da espécie em estudo.

À **FMT-TO**, pelo apoio institucional e financeiro, sem o qual não teria sido possível a realização desta pesquisa.

Aos **colegas da FMT-TO**, pelas sugestões oportunas, apoio e incentivo constante.

Aos amigos **Rosa, Clayton e Adriana** do grupo de pesquisa de Produtos Naturais da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas (UnUCET) - UEG – Anápolis, pelas valiosas contribuições e demonstrações de amizade que me permitiram concluir com êxito este trabalho.

Ao colega **Fábio Cruz**, companheiro incansável, que participou de todas as etapas deste estudo, contribuindo, sofrendo, vibrando, incentivando. Obrigada por tudo, amigo.

Aos ex-alunos e estagiários da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins (FMT-TO), **Lânea, Adson Jr., Renato e Ákila** pela consistente contribuição na execução desta pesquisa, muito obrigada.

Aos ex-alunos e estagiários da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins (FMT-TO), **Eduardo, Marta, Fábio, Rejane e Kay Anne** e ao colega **Wlisses** da FMT-TO pela contribuição na tabulação dos dados do Levantamento Etnofarmacológico do Bosque da Biodiversidade do Tocantins.

Aos meus sobrinhos **Wanessa, Adevaldo, Vinícius, Camila e Gabriela**, pelo amor e momentos de alegria.

Aos manos **Marilene, Nicinha, João Antônio e Valéria**, pelo amor e apoio sempre presentes.

A todos os colegas do mestrado pela amizade, apoio e incentivo.

E a todos que direta ou indiretamente, participaram comigo na realização deste sonho de vida, incentivando e vibrando por cada conquista, minha eterna gratidão.

RESUMO

As plantas medicinais têm sido uma rica fonte para obtenção de moléculas bioativas, constituindo-se numa das mais bem sucedidas estratégias na descoberta de novos medicamentos. A espécie *Cochlospermum regium* (Martius e Schrank) Pilger (Bixaceae), popularmente conhecida como algodãozinho-do-campo, é uma planta nativa, abundante no cerrado brasileiro. No Tocantins, levantamento etnobotânico e etnofarmacológico realizado demonstrou que esta planta é utilizada na medicina popular no tratamento de várias enfermidades. Entre as indicações terapêuticas mais freqüentes estão: inflamações ginecológicas e renais, prostatites, dores diversas, febre, gastrite e afecções de pele, entre outras. Assim, este trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento dos constituintes químicos de *C. regium*. Para tanto, foram obtidos extratos macerando-se diretamente, de forma exaustiva, as raízes da espécie nos solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, nesta seqüência crescente de polaridade, obtendo-se o seguinte rendimento da massa bruta macerada: 1,78%, 0,23%; 0,51% e 12,16%, respectivamente. A análise fitoquímica do extrato hexano (CrRH) permitiu o isolamento das substâncias identificadas inicialmente como SA (7,0mg), composto inédito, ainda em processo de caracterização e Substância SB (20,0 mg), identificada como excelsina, uma lignana reportada pela primeira vez nesta espécie. Da fração CrRH1 proveniente do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico, isolou-se a substância SC (6,0 mg) identificada como esteróide, ainda em fase de elucidação estrutural. Do extrato diclorometânico (CrRD) foi isolada a substância SD (9,0 mg), identificada como ácido p-hidroxicinâmico estereato, cuja estrutura ainda não está totalmente definida. Dados obtidos até o momento apontam a existência uma mistura de ácidos p-hidroxicinâmicos, provavelmente variando o tamanho da cadeia lateral do éster. Do fracionamento do extrato acetato de etila obteve-se a substância SE (23mg) originada da fração CrRAc1 e identificada como naringenina, flavanona comum no gênero *Cochlospermum*, tendo sido isolada, também, na casca do caule desta espécie, não havendo, entretanto, relatos da presença desta flavonona em raiz de *C. regium*. E finalmente, a substância SF (15,0 mg) originada da fração CrRAc2, que também foi identificada como excelsina.

Palavras-chave: *Cochlospermum regium*, flavavona, excelsina, naringenina, ácido p-hidroxicinâmico estereato.

ABSTRACT

The medicinal plants have been a rich source for obtaining bioactive molecules, constituting one of the most successful strategies in the discovery of novel medicines. The specie *Cochlospermum regium* (Martius and Schrank) Pilger (Bixaceae), popularly known as algodãozinho-do-campo is a native plant, abundant in Brazilian Cerrado. After an ethnobotanical and ethnopharmacological research carried out at Tocantins State it was showed that this plant is used in folk medicine to treat several illnesses. Among the therapeutic indications the most frequents are: gynecological and renal inflammations, prostatitis, a few kinds of pains, fever, gastritis and skin affections, among others. This study aimed to contribute to the knowledge of the chemical constituents of *C. regium*. For this, extracts solutions were obtained by an exhausting way maceration of this plants roots in the solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol, in this sequence increasing polarity, obtaining the following income rude mass macerated: 1,78%, 0,23%; 0,51% and 12,16%, respectively. The phytochemical investigation of the hexane extract (CrRH) allowed the isolation of substance initially identified as SA (7,0 mg), an unpublished chemical compound, still in characterization process and Substance SB (20,0 mg), identified as excelsina, a lignan reported for the first time in this specie. From the CrRH1 fraction originated by the fractionating chromatography column of the hexane extract was isolated the substance SC (6,0 mg) identified as a steroid, still in structural elucidation. From the dichloromethane extract (CrRD) the substance SD (9,0 mg) was isolated and identified as p-hydroxicinamic acid stearate, whose structures are not yet fully defined. Data obtained so far indicate the existence of a mixture of p-hydroxicinâmíc acids, probably varying the size of the side chain ester. On the fractionation of ethyl acetate extract was obtained the substance SE (23mg) originated from the CrRAc1 fraction and identified as naringenin, a common flavanone in the genus *Cochlospermum*, have been also isolated in the stalk bark of this specie, not having, however, reports the presence of this flavanone in roots of *C. regium*. And finally, the SF substance (15,0 mg), originated of the CrRAc2 fraction, which was also identified as excelsina.

Keywords: *Cochlospermum regium*, flavavon, excelsina, naringenin, p-hydroxycinnamic acid stearate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos	32
Figura 2. Esquema geral para obtenção de extratos diretamente da planta.....	35
Figura 3. Mapa do Bioma Cerrado Brasileiro.....	45
Figura 4. Mapa da distribuição geográfica do gênero <i>Cochlospermum</i>	49
Figura 5. <i>Cochlospermum regium</i>	53
Figura 6. Coleta da raiz de <i>C. regium</i> feita por um mateiro.....	60
Figura 7. Fluxograma geral de obtenção dos extratos da raiz de <i>C. regium</i>	61
Figura 8. Fluxograma do processo de fracionamento do extrato hexânico (CrRH) das raízes de <i>C. regium</i>	63
Figura 9. Fluxograma do processo de purificação da fração hexânica (CrRH1) da raiz de <i>C. regium</i>	64
Figura 10. Fluxograma do processo de fracionamento do extrato diclorometânico (CrRD) das raízes de <i>C. regium</i>	65
Figura 11. Fluxograma do processo de fracionamento do extrato acetato de etila (CrRAc) da raiz de <i>C. regium</i>	66
Figura 12. Fluxograma do processo de refracionamento e purificação da fração acetato de etila CrRAc1 de <i>C. regium</i>	67
Figura 13. Fluxograma do processo de refracionamento e purificação da fração acetato de etila CrRAc2 de <i>C. regium</i>	68
Figura 14. Estrutura química da excelsina.....	74
Figura 15. Estrutura química do ácido p-hidroxicinâmico esterificado.....	75
Figura 16. Estrutura química da naringenina	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Distribuição da população pesquisada no Levantamento Etnobotânico e Etnofarmacológico do Projeto Bosque da Biodiversidade por Sexo..	69
TABELA 2	Distribuição da população pesquisada no Levantamento Etnobotânico e Etnofarmacológico do Projeto Bosque da Biodiversidade por faixa etária.....	70
TABELA 3	Resultado da seleção da espécie a ser estudada a partir do Levantamento Etnobotânico e Etnofarmacológico do Projeto Bosque da Biodiversidade	71
TABELA 4	Resultado do rendimento dos extratos brutos extraídos da raiz de <i>C. regium</i>	72
TABELA 5	Rendimento das substâncias isoladas a partir dos extratos e do material vegetal de partida	72

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Alguns fármacos obtidos exclusivamente de matérias-primas vegetais.....	38
QUADRO 2. Exemplos de substâncias obtidas de plantas que funcionam como protótipo ou modelo para outros medicamentos.....	39
QUADRO 3. Alguns adjuvantes farmacêuticos de origem vegetal.....	40
QUADRO 4. Algumas matérias-primas vegetais usadas na semi-síntese de fármacos.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etila
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
<i>C. regium</i>	- <i>Cochlospermum reguim</i>
CC	- Cromatografia em coluna
CCDA	- Cromatografia em camada delgada analítica
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CG/EM	- Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa
DCM	- Diclorometano
DMSO	- Dimetilsulfóxido
EM	- Espectrometria de massa
Fig.	Figura
FMT-TO	- Fundação de Medicina Tropical do Tocantins
Hex	- Hexano
i. p.	- Intraperitoneal
IV	- Infravermelho
MeOH	Metanol
MHz	- Mega Hertz
OMS	- Organização Mundial da Saúde
p.	Página
PA	- Pureza analítica
Rf	- Fator de retenção
RMN ¹ H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	- Ressonância magnética nuclear de carbono 13
TMS	- Trimetilsilano
UEG	- Universidade Estadual de Goiás
UNITINS	- Universidade do Tocantins
UV	- Ultravioleta

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	18
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2. PLANTAS MEDICINAIS	23
2.1. Considerações Gerais	23
2.2. Aspectos Fitoquímicos	27
2.2.1. A Fitoquímica no Brasil	28
2.2.1.1. O ressurgimento dos produtos naturais como fonte de novos fármacos	30
2.2.2. Procedimentos gerais para a obtenção de princípios ativos de origem vegetal..	30
2.2.3. Seleção de espécies vegetais	32
2.2.4. Preparo dos extratos vegetais	34
2.2.5. Fracionamento, isolamento e identificação dos constituintes químicos	35
2.3. Importância das Plantas Medicinais na Terapêutica Atual	37
2.4. Importância da validação de plantas medicinais e novos fitoterápicos	41
2.5. Plantas Medicinais do Cerrado	44
2.6. A PLANTA <i>Cochlospermum. regium</i>	48
2.6.1. Aspectos botânicos	48
2.6.1.1. Características da Família Bixaceae	48
2.6.1.2. Características da espécie <i>Cochlospermum regium</i> (Mart. & Schrank) Pilger.....	51

2.6.2. Etnobotânica	54
2.6.3. Fitoquímica e Atividade Biológicas.....	54
III. PARTE EXPERIMENTAL	58
3. MATERIAL E MÉTODOS	58
3.1. SOLVENTES	58
3.1.1. Para cromatografia	58
3.1.2. Para ressonância magnética nuclear.....	58
3.2. REVELADORES	58
3.3. MATERIAL CROMATOGRÁFICO	58
3.3.1. Cromatografia em coluna de vidro (CC)	58
3.3.2. Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)	58
3.4. MATERIAL VEGETAL	59
3.4.1 Seleção da Planta	59
3.4.2 Coleta e identificação	59
3.5 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	60
3.5.1. Método de obtenção dos extratos brutos	60
3.5.2. Isolamento e purificação dos constituintes químicos obtidos de raiz de <i>C. regium</i>	62
3.5.2.1. Fracionamento cromatográfico extrato hexânico (CrRH) da raiz de <i>C. regium</i>	62
3.5.2.1.1. Fracionamento, isolamento e purificação das substâncias presentes na fração CrRH1.....	63
3.5.2.2. Fracionamento cromatográfico extrato DCM (CrRD) das raízes de <i>C. regium</i>	64

3.5.2.3. Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt (CrRAc) das raízes de <i>C. regium</i>.....	65
3.5.2.3.1. Fracionamento cromatográfico fração CrRAc1 do extrato AcOEt.....	66
3.5.2.3.2 Fracionamento cromatográfico das frações CrRAc2 e CrRAc2-1 do extrato acetato de etila da raiz de <i>C. regium</i>	67
3.6. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS.....	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	69
4.1. Resultado do Levantamento Etnobotânico e Etnofarmacológico	69
4.2. Resultado da seleção da espécie.....	70
4.3. Resultados da extração dos extratos brutos	71
4.4. Resultados do fracionamento por cromatografia de adsorção dos extratos brutos	72
4.5. Identificação das substâncias isoladas	73
CONCLUSÕES	76
PERSPECTIVAS E RESULTADOS ESPERADOS.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

I. INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, temas como biodiversidade, plantas medicinais e desenvolvimento de novos medicamentos têm sido amplamente discutidos, em virtude de sua relevância e do seu caráter estratégico, especialmente em países considerados emergentes, como o Brasil (SIMÕES e SCHENKEL, 2002). Segundo Barreiro e Bolzani (2009), em termos econômicos a biodiversidade transcende as fronteiras usualmente dadas pelas indústrias convencionais, por ser valiosa fonte de dados biológicos e químicos de grande utilidade para a descoberta novas drogas. Ainda conforme estes autores, o uso de produtos naturais tem sido a estratégia mais bem sucedida na descoberta de novos medicamentos e os maiores avanços nesta área estão baseados em produtos naturais.

Apesar de possuir a maior diversidade vegetal do mundo, o Brasil conhece muito pouco acerca de sua flora nativa e, em especial, das propriedades medicinais que essas plantas possam apresentar (GUERRA e NODARI, 2007). Assim, a imensa diversidade biológica dos biomas brasileiros, pela sua capacidade de gerar novos conhecimentos e inovações tecnológicas, pode ser uma valiosa alternativa como matéria prima para o descobrimento de medicamentos (BARREIRO e BOLZANI, 2009).

Se por um lado, a maior parte das plantas medicinais cultivadas no Brasil são espécies exóticas de origem mediterrânea, trazidas para o país durante o processo de colonização, por outro, observa-se que várias espécies nativas têm sido largamente empregadas pela população, cujo conhecimento acerca de seu uso medicinal foi desenvolvido inicialmente por comunidades indígenas e caboclas do país (REIS, MARIOT e STEENBOCK, 2007). Neste cenário, vale ressaltar que o Brasil apresenta em seus vinte biomas, uma diversidade de espécies medicinais, que constitui uma das mais importantes fontes de princípios ativos do planeta, por isso, as perspectivas do conhecimento das plantas medicinais pela comunidade tradicional, indígena, raizeiros, quilombolas são altamente promissoras (MILWARD-DE-AZEVEDO, 2008). Cabe salientar, que as sociedades tradicionais ou autóctones possuem uma extensa farmacopéia natural proveniente dos recursos vegetais encontrados nos ambientes naturais por elas ocupados, ou cultivados em ambientes antropicamente alterados (AMOROZO, 2002). Diante disso, é importante considerar que o conhecimento das plantas por grupos étnicos e comunidades tradicionais constitui um valioso atalho para a descoberta de fármacos, uma vez que pode ser considerado

como uma pré-triagem à sua utilização na terapêutica humana (ELISABETSKY e SOUZA, 2007).

Em contrapartida, outro aspecto relevante observado é que, na maioria das vezes, as diversas plantas usadas pela população brasileira com inúmeras indicações ditas medicinais, não possuem estudos científicos sobre a atividade farmacológica na qual dizem ter potencial, precisando assim, de maior investigação química, farmacológica e toxicológica. Estas investigações poderão não só confirmar um efeito orientado popularmente, como também estabelecer novas ações e informações toxicológicas que possam favorecer a indústria químico-farmacêutica nacional, em busca de novos princípios ativos e/ou de produtos farmacêuticos exóticos e/ou inéditos, ou ser usados na saúde pública, através do Sistema Único de Saúde (SUS) (LAPA, 2007).

Dentro deste contexto, destaca-se o Bioma Cerrado, ocupando extensa área do território brasileiro, situado em regiões de grande desenvolvimento que naturalmente possui em sua vegetação espécies que exercem forte influência na medicina popular (RODRIGUES e CARVALHO, 2001; RIBEIRO e WALTER, 1998). O Bioma Cerrado representa o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado, em área, apenas pela Amazônia (KLINK e MACHADO, 2005), possuindo uma das maiores floras vegetais do mundo, estimada em 10 mil espécies de plantas diferentes (WWF-BRASIL, 2009).

Além disso, o Cerrado brasileiro tem a seu favor o fato de ser cortado por três das maiores bacias hidrográficas da América do Sul, ou seja, as bacias do Tocantins, do São Francisco e do Prata, o que favorece a manutenção de uma biodiversidade surpreendente (WWF-BRASIL, 2009). Dessa forma, o Cerrado compõe um cenário de exuberante diversidade biológica e influente no arcabouço cultural das populações que nele vivem (MENDONÇA, FELFINI e WALTER, 1998).

Entretanto, cerca de metade dos dois milhões de Km² de sua vegetação já foram transformadas em pastagens, culturas anuais e outros tipos de uso (KLINK e MACHADO, 2005). Por essa razão, passou a ser considerado um *hotspot* mundial - entendendo-se por *hot spot* toda área prioritária para conservação, isto é, de rica biodiversidade e ameaçada no mais alto grau. É considerada *hotspot* uma área com pelo menos 1.500 espécies endêmicas de plantas e que tenha perdido mais de 3/4 de sua vegetação original (RHODIN, 2009).

Neste contexto, Kaplan, Figueiredo e Gottlieb (1994) alertam para necessidade de valorizar os recursos que ele oferece que estão sob forte pressão de extinção, sob pena de estarem indisponíveis às futuras gerações. Dentre estes recursos, deve-se considerar o

terapêutico, oferecido pelas plantas medicinais (GUARIM NETO e MORAIS, 2003; KAPLAN, FIGUEIREDO e GOTTLIEB, 1994; YUNES e CECHINEL FILHO, 2001), como, por exemplo, a espécie *Cochlospermum regium*, que após levantamento realizado pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente) e Governo do Estado do Paraná, passou a integrar a lista “Plantas Medicinais Ameaçadas de Extinção”, na categoria “em perigo”, naquele Estado (NOGUEIRA *et al.*, 1998). Da mesma forma, na região centro-oeste, como resultado de um estudo sobre o extrativismo de plantas medicinais do cerrado, a espécie *C. regium* foi, mais uma vez, incluída numa lista de espécies consideradas de alta prioridade para conservação (VIEIRA *et al.* 2002).

No Tocantins, levantamento etnobotânico e etnofarmacológico realizado em dez cidades do Estado (UNITINS/MS/MMA - FMT-TO, 1998), apresentou a espécie *C. regium*, conhecida como algodãozinho-do-campo, como uma das plantas mais citadas. Segundo esta pesquisa, a casca da raiz e do caule desta planta tem sido usada pela população tocantinense, para “cura de diversos males” tais como, gastrite, úlcera péptica, infecções ginecológicas, intestinais e dores internas, entre outras.

Levantamento bibliográfico realizado nas bases de dados CAPES, LILACS, PubMed e MEDLINE, anais de congressos, jornadas e simpósios, artigos publicados em periódicos, dissertações e teses mostrou uma inconsistência de estudos para a referida espécie. Dados científicos compilados por MORAIS *et al.* (2005) sobre a ação biológica de *C. regium* indicaram haver alguns estudos que corroboram o uso medicinal tradicional, entretanto, ressaltaram a necessidade de maior contribuição científica para garantir o seu uso seguro. Sólón, Brandão e Siqueira (2009) afirmam que os dados científicos adquiridos sobre o perfil químico e farmacognóstico até o momento, respaldam, apenas em parte, a segurança e eficácia de seu uso.

Neste cenário, destaca-se o fitoterápico “Extrato Composto Magaraz” indicado para o tratamento de úlcera, gastrite, má digestão e infecção urinária, que possui em sua formulação o extrato de *C. regium*. Este medicamento teve sua apreensão e recolhimento em todo o território nacional determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução nº 1.175 de 08 de julho de 2002, por falta de comprovação de eficácia (BRASIL, 2002).

Entretanto, nos diversos estudos publicados sobre o gênero *Cochlospermum*, várias atividades farmacológicas lhes foram atribuídas, tais como atividade hepatoprotetora, antimalárica, antibacteriana, antitumoral, antiviral, desintoxicante, anti-leishmanial, anti-

hipertensiva, anti-diabética, antiinflamatória, anti-shistosomose e anti-diarréica (NEGARD *et al.*, 2005; DIALLO *et al.*, 1992; DIALLO *et al.*, 1989; PRESBER *et al.*, 1992; PRESBER *et al.*, 1987; ALIYU, OKOYE e SHIER, 1995; SÁNCHEZ-SALGADO *et al.*, 2007; BENOIT-VICAL *et al.*, 1999; BENOIT *et al.*, 1995; BENOIT-VICAL *et al.*, 2003; SOH e BENOIT-VICAL, 2007; ANTHONY, FYPE e SMITH, 2005; VONTHRON-SÉNÉCHEAU *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 1996; BRUM *et al.*, 1997; VINOD *et al.*, 2008), entre outras.

Entre os constituintes químicos mais frequentemente isolados no gênero foram relatados os triacilbenzenos e os flavonóides (ALMEIDA *et al.*, 2005). Dentre estes últimos, foram identificados a miricetina, a quercetina, o ácido arjunólico, a aromadendrina, o kampferol, a naringenina e a apigenina, nas formas livres ou combinadas, formando os glicosídeos: naringenina 7-O-glucosídeo, apigenina 7-O-glucosídeo, 5,7,4'-trihydroxy-flavan-3-ol e dihidrokaempferol 3-O-glucopiranoside (LIMA *et al.*, 1995; DIALLO, VANHAELEN-FASTRB e VANHAELEN, 1991; SÁNCHEZ-SALGADO *et al.*, 2007; COOK e KNOX, 1975; LEAL, 1988), entre outros. A presença de polissacarídeos também foi largamente relatada neste gênero (OJHA *et al.*, 2008; JANAKI e SASHIDHAR, 1998; VINOD *et al.*, 2008; NEGARD *et al.*, 2005).

Diante do exposto, considera-se que os vegetais são reservatórios potenciais de fármacos, a partir dos quais se isolam e identificam-se estruturalmente substâncias ativas, sendo, possível recriá-los por síntese total em laboratório ou utilizar a substância isolada como material de partida para a criação de estruturas químicas diferentes, obtidas por procedimentos de modelagem molecular (HEEMANN, 2002). Considerando que no Brasil, as pesquisas para descoberta de fitofármacos e/ou protótipos de fármacos, além de propiciarem o avanço da pesquisa básica multidisciplinar, podem contribuir também para o desenvolvimento tecnológico nacional, levando em conta a mencionada diversidade micromolecular dos inúmeros biomas brasileiros, ainda muito pouco explorada como uma fonte de substâncias de interesse farmacológico (BARREIRO e BOLZANI, 2009), espera-se que esta pesquisa, contribuindo para a identificação de substâncias biologicamente ativas, possa gerar oportunidades para a industrialização e a comercialização de medicamentos seguros e de eficácia comprovada.

Neste contexto, o presente trabalho justificou-se na medida em que propôs colaborar para a caracterização fitoquímica de *C. regium*, ainda não suficientemente estudada, tendo em vista sua ampla utilização na medicina popular brasileira.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo geral contribuir para o conhecimento dos constituintes fitoquímicos de *Cochlospermum regium* (Bixaceae) e como objetivos específicos: selecionar a partir de dados etnobotânicos e etnofarmacológicos a planta a ser estudada; coletar e identificar botanicamente a espécie; obter extratos hexânico, diclorometânico, acetato de etila e metanólico de *C. regium*; isolar e identificar os principais metabólitos de *C. regium*, por meio de técnicas cromatográficas e de recristalização; e determinar a estrutura química de compostos isolados através da espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RNM).

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. PLANTAS MEDICINAIS

2.1. Considerações Gerais

O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos passando das formas mais simples, provavelmente usadas pelos seres humanos das cavernas, até chegar às formas industrializadas com tecnologias sofisticadas, utilizadas na atualidade. Mas apesar da distância, estas formas têm um fato em comum, em ambos os casos o homem percebeu nas plantas a presença de algo que tem a propriedade de provocar reações benéficas no organismo e resultar na recuperação da saúde (LORENZI e MATOS, 2002). Durante milênios se utilizou empiricamente de diversas maneiras os recursos oferecidos pela natureza. Para garantir sua sobrevivência e melhor adaptação ao meio, aprofundou-se nos conhecimentos sobre esta, demonstrando, como conseqüência, uma estreita relação entre o uso das plantas e seu processo evolutivo (MIGUEL e MIGUEL, 2000).

Apesar disso, ainda é muito pequena a fração aproveitada pela espécie humana, das plantas com as quais sempre conviveu e que a antecederam no planeta Terra. O reino vegetal ainda permanece como uma grande incógnita, de onde a humanidade, ao longo de sua existência, selecionou apenas cerca de 300 plantas para a alimentação, obteve princípios ativos puros para o tratamento de doenças, de pouco mais de uma centena (PINTO *et al.*, 2002) e apenas 15 a 17% foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991; GUERRA e NODARI, 2007; FOGGIO *et al.*, 2006). Estes números são bem modestos quando se está diante de um universo de aproximadamente 350.000 espécies de plantas superiores. Cabe aqui ressaltar, que deste total de espécies catalogadas em todo mundo, cerca de 120.000 ocorrem no Brasil (YUNES e CALIXTO, 2001).

Graças aos seus 20 biomas, o Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, o que constitui um verdadeiro patrimônio genético, científico, tecnológico, econômico e cultural, que precisa ser conhecido, pesquisado e preservado, não podendo, portanto, abdicar de sua vocação para os produtos naturais (BRASIL, 2006). Possuindo característica territorial

muito diferente dos países industrializados, marcada principalmente por essa imensa biodiversidade, estimada em 20% do patrimônio genético da humanidade, com um índice de endemismo altíssimo, o país representa um celeiro para a busca de novas substâncias de interesse biológico. Aqui, os pesquisadores desta área têm à mão a matéria prima mais abundante e diversificada do planeta (PINTO *et al.*, 2002).

Além disso, as novas tendências mundiais de preocupação com a biodiversidade e o desenvolvimento sustentável, trazem novas perspectivas ao estudo das plantas medicinais brasileiras e impulsionam a fitoterapia a despertar interesse geral. Assim, na busca de bases mais sólidas para a validação científica do uso de plantas medicinais, novas linhas de pesquisas vêm sendo promovidas em universidades brasileiras (LORENZI e MATOS, 2002). Porém, apesar da exploração de produtos naturais ser uma das características marcantes de países em desenvolvimento, a inovação tecnológica em pesquisa tem sido escassa. No Brasil, as inovações têm sido de baixa ou média intensidade, sendo os fitoterápicos mais vendidos no mercado brasileiro, produzidos a partir de espécies estrangeiras (WAGNER, 2002). Por outro lado, grandes empresas sediadas em países industrializados, como Alemanha, França, Estados Unidos e Japão, vêm aplicando competências científicas e tecnológicas no desenvolvimento de produtos derivados de plantas medicinais, muitas vezes oriundas dos países em desenvolvimento, com emprego tradicional e se consolidando como líderes neste crescente e promissor mercado (YUNES, PEDROSA e CECHINEL FILHO, 2001). Cabe destacar que, na maioria das vezes, não há uma partilha de benefícios com o país de origem da matéria-prima ou com as comunidades tradicionais que lhes indicaram as aplicações das plantas convertidas em um produto final (MENCONI e ROCHA, 2003).

Entretanto, dentro deste cenário, nota-se ressurgir nos últimos anos, o interesse em trabalhar com a fitoterapia. Tendo, a última década, registrado aumento expressivo no interesse por substâncias derivadas de espécies vegetais, o que pode ser evidenciado pelo crescimento no número de publicações dessa linha de pesquisa, nas principais revistas científicas das áreas de química e farmacologia (CALIXTO, 2000).

O Brasil, pertencendo a uma minoria de países ditos mega-diversos que se distinguem por seus níveis de desenvolvimento em pesquisa científica, conta com universidades e institutos de pesquisa bem equipados, pesquisadores preparados e comunidades tradicionais detentoras de amplos conhecimentos de espécies vegetais e animais (FUNARI e FERRO, 2005). Destaca ainda, por seu invejável sistema de pós-graduação capaz de formar oito mil doutores por ano, com produtividade de seu sistema de ciência e tecnologia

responsável por 1,3 a 1,5% do novo conhecimento mundial, alcançando, nestes termos, um nível de maturidade científica, que pode responder com pleno sucesso aos desafios contemporâneos na área do fármaco e do medicamento, caso hajam ações políticas efetivas (VIEGAS JÚNIOR, BOLZANI e BARREIRO, 2006; SANT'ANA e ASSAD, 2004). De onde se pode concluir que o país tem potencial para ocupar lugar de destaque, em biotecnologia, no cenário internacional (FUNARI e FERRO, 2005).

Nesse sentido, com o objetivo de avaliar cientificamente os benefícios da utilização de medicamentos fitoterápicos e de conhecer ao mesmo tempo, os riscos de seu uso indevido, a Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1978, tem incentivado o estudo de plantas tradicionalmente conhecidas como medicinais (MIGUEL e MIGUEL, 2000). Dessa forma, o grande desafio passa a ser desvendar e validar cientificamente espécies vegetais com potencial clínico, cuja efetividade resultaria de um grupo de pesquisa multidisciplinar nos quais colaborariam fitoquímicos, botânicos sistemáticos, farmacologistas e microbiologistas (RATES, 2001). Muitos centros de pesquisa, em todo o mundo, vêm desenvolvendo estudos sobre as propriedades farmacológicas das plantas medicinais. No entanto, faltam ainda evidências laboratoriais e clínicas sobre a eficácia e a segurança de seu emprego, tanto em animais como em seres humanos. Os supostos méritos terapêuticos que possuem devem-se ainda, principalmente, a informações empíricas e subjetivas da medicina folclórica (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001; FOGLIO, 2006). O estado da arte da maioria dos fitoterápicos fabricados pela indústria brasileira está, atualmente, fundamentado somente no uso popular das plantas, sem nenhuma comprovação pré-clínica ou clínica não podendo, portanto, serem competitivos a nível nacional e muito menos internacional (YUNES, PEDROSA e CECHINEL FILHO, 2001; MILWARD-DE-AZEVEDO, 2008)

Grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não tem estudos para permitir a elaboração de monografias completas e modernas. Muitas espécies são usadas sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança. Estes dados demonstram que ainda existe no Brasil uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e as pesquisas. Desse modo, considera-se este, um fator de grande incentivo ao estudo com plantas, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos, representando, o reino vegetal, em virtude desta pouca quantidade de espécies estudadas, um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas (FOGLIO *et al.*, 2006). A prospecção ética da biodiversidade, visando agregar ciência e tecnologia a seus produtos, passa a ter importância estratégica para os países em desenvolvimento, sendo um

instrumento tanto para a descoberta de alternativas para o tratamento de doenças típicas destes países, como para estimular o crescimento de suas economias (MIGUEL e MIGUEL, 2004).

Por outro lado, para tornar o acesso à saúde pública mais abrangente e de melhor qualidade aos países em desenvolvimento, a World Health Organization (WHO) (2002) considera fundamental a criação de modelos nacionais de saúde, pautados em suas aptidões e carências. Hoje, a condição de meros compradores de tecnologias importadas ou pagadores de *royalties* para grandes laboratórios estrangeiros, situação agravada no Brasil após a promulgação da legislação sobre propriedade intelectual (VOGT, 2001), torna o processo de inclusão no sistema de saúde vigente muito oneroso, não atendendo, na maioria das vezes às necessidades específicas de cada país (FUNARI e FERRO, 2003).

E este debate se torna ainda mais relevante quando se considera além da riqueza de biodiversidade, os conhecimentos tradicionais e a elevada incidência das chamadas “doenças negligenciadas”, tais como leishmaniose, tuberculose, malária, mal de chagas, esquistossomose e doença do sono, como é o caso do Brasil (FUNARI e FERRO, 2003). Sabe-se que o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento destas doenças que afetam, sobretudo, populações de países em desenvolvimento, pouco interessa à indústria farmacêutica mundial (MOREL, 2006). Esta realidade pode ser verificada comparando-se o número de novos produtos desenvolvidos para o tratamento dessas doenças e para doenças cardiovasculares, entre 1975 e 1999. Observa-se que somente 15 novos produtos foram desenvolvidos para o tratamento das primeiras, enquanto no mesmo período, surgiram 179 novas drogas para atender portadores de doenças cardiovasculares (ATAS, 2003).

Aqui é importante ressaltar, que a OMS reconhece no conhecimento tradicional sobre produtos da biodiversidade um importante instrumento no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos para o combate de doenças que assolam as populações dos países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). A opção de conduzir pesquisas a partir da indicação de plantas utilizadas por comunidades pode se constituir em valioso atalho para descoberta de fármacos, já que seu uso tradicional pode ser encarado como uma pré-triagem quanto à utilidade terapêutica em humanos (ELISABETSKY e SOUZA, 2007). Este conjunto de conhecimentos, conhecido como etnobotânica, se ocupa da inter-relação direta entre pessoas e plantas, incluindo todas as formas de percepção e apropriação dos recursos vegetais (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006). A etnobotânica é citada na literatura como sendo um dos caminhos alternativos que mais evoluiu nos últimos anos para a descoberta de produtos naturais bioativos e trabalha em estreita cumplicidade com a

etnofarmacologia, que consiste na exploração científica e interdisciplinar de agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados por determinado agrupamento humano (MACIEL *et al.*, 2002). As investigações etnodirigidas, isto é, etnofarmacológicas e etnobotânicas têm sido as principais abordagens reconhecidas por cientistas em todo o mundo, como uma estratégia de seleção de plantas medicinais (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006).

Neste panorama, a fitoquímica é muito mais importante e decisiva para o Brasil, ao se considerar sua grande riqueza vegetal ainda sem estudo, aliada às possibilidades para o desenvolvimento de novos medicamentos. Torna-se, portanto, necessária a implantação de um programa comprometido, contínuo e eficiente, requerido para uma conquista de valores na área científico-tecnológica (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001)

Diante do exposto, ressalta-se a necessidade de uma atuação multidisciplinar que o estudo com as plantas exige, de tal forma que esta integração possa ampliar as possibilidades na busca de novas moléculas ativas. Para o estudo fitoquímico, esta abordagem tem papel importante na pesquisa com plantas medicinais (MACIEL *et al.*, 2002).

2.2 Aspectos Fitoquímicos

O organismo vivo pode ser considerado um laboratório biossintético (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997) produzindo, primariamente, substâncias essenciais à sua sobrevivência e comuns a todos os seres vivos, que são definidas como metabólitos primários. Apresenta, ainda, todo um arsenal metabólico capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor, embora garantam vantagens para sua sobrevivência, permitindo sua adequação a seu ecossistema (SANTOS, 2007). A estas substâncias, definidas como metabólitos secundários, foram atribuídas funções de defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra raios ultravioleta (UV), atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (SANTOS, 2007; CORRÊA *et al.*, 2008), bem como sua participação em alelopatias, entre outras. Em relação a este metabolismo, destaca-se como característica importante dos vegetais, a sua elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas, quanto à sua diversidade numa mesma espécie (HARBORNE, 1988; SANTOS, 2007).

Para Santos, (2007), o aparecimento de metabólitos biologicamente ativos na natureza é determinado por necessidades ecológicas, aliadas às possibilidades biossintéticas, sendo a síntese de metabólitos secundários conduzida pela co-evolução de plantas, insetos, microorganismos e mamíferos, com função de defesa ou atração, principalmente. Dessa forma, por serem fator de interação entre os organismos, os metabólitos secundários apresentam atividades biológicas interessantes, aonde pesquisadores vêm fontes promissoras de novas moléculas potencialmente úteis ao homem.

O desenvolvimento do estudo químico de plantas, ou seja, fitoquímico está diretamente relacionado à utilização e desenvolvimento de técnicas rápidas e precisas, que permitam o isolamento de compostos de interesse, normalmente presentes em pequenas quantidades, concomitantemente com constituintes químicos já conhecidos e de grande ocorrência em plantas (FERRI, 1996).

2.2.1 A Fitoquímica no Brasil

Até a chegada do Século XX, o Brasil era essencialmente rural e usava amplamente a flora medicinal, tanto a nativa, como a introduzida pelos europeus no período de sua colonização. A medicina popular do país tornou-se o reflexo das uniões étnicas entre os diferentes imigrantes e os inúmeros povos autóctones que difundiram o conhecimento das ervas locais e de seus usos, aprimorando e transmitindo-os de geração em geração (LORENZI e MATOS, 2002). Este período apresenta a fitoquímica de plantas medicinais integrada à química medicinal e à medicina, a procura dos princípios ativos das plantas consagradas por este saber popular. Como consequência muitos fármacos, ou seja, compostos puros extraídos de plantas foram obtidos, sendo muitos deles, ainda amplamente usados na terapêutica atual, como a codeína, a efedrina, a quinina, a morfina e a atropina, entre outros (YUNES e CALIXTO, 2001). No entanto, este conhecimento tradicional ficou em segundo plano após o processo de industrialização e a subsequente urbanização do país (LORENZI e MATOS, 2002). O século passado presenciou o desenvolvimento da indústria farmacêutica impulsionado pelos avanços crescentes no isolamento e síntese de substâncias farmacologicamente ativas. Neste cenário, o tratamento com plantas medicinais, base da terapêutica até então, fica restrito ao uso popular justificado por sua natureza empírica, tendo sido suas propriedades, progressivamente, desacreditadas perante a sociedade (NIWA *et al.*,

1991). As plantas medicinais, consideradas sem valor científico, passam a ser usadas por pessoas sem cultura científica. Como produtos naturais de importância terapêutica, aparecem apenas os antibióticos obtidos de fungos (YUNES e CALIXTO, 2001).

Para esses autores, consolidava-se neste período o paradigma ocidental de que “fármaco é uma molécula pura, geralmente oriunda de síntese, cujo modelo foi a aspirina (AAS)”. Afirmam ainda que, em contraposição ao período anterior, as sínteses são realizadas geralmente ao acaso, buscando encontrar atividades biológicas a partir de *screening* maciço.

Este processo mostrou grandes problemas, uma vez que as chances de encontrar um novo fármaco por *screening* ao acaso diminuía, progressivamente, a cada ano, sendo necessário testar um número muito grande de compostos para se obter uma substância ativa. Também era questionável o uso de protótipos, pois a otimização dos efeitos resultava em um processo extremamente oneroso (YUNES e CALIXTO, 2001).

Diante deste contexto, apareceram na atualidade várias metodologias para a obtenção de fármacos, tais como a abordagem biotecnológica, que possibilitou identificar e preparar diversas proteínas; a química combinatória, que permitiu o desenvolvimento de técnicas de triagem em larga escala como o *HTS (High-throughput screening)* que permite que até 100 mil compostos sejam testados em relação a sua atividade biológica, num único dia e a química computacional que correlaciona a estrutura molecular com a atividade biológica (YUNES, PEDROSA e CECHINEL FILHO, 2001). Até o presente, a química combinatória não conseguiu atingir seu objetivo de ser uma fonte primária de expressiva diversidade química, que asseguraria a descoberta de numerosas moléculas ativas capazes de representarem, efetivamente, novos candidatos a fármacos inovadores (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001).

Apesar dos avanços tecnológicos observados, nesse período, para a pesquisa de novas entidades químicas (NCEs), a quantidade de novos fármacos lançados no mercado não tem aumentado proporcionalmente (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001). A indústria farmacêutica que pesquisa novos fármacos afirma que, em 2004, o montante gasto em pesquisa e desenvolvimento no setor, atingiu valores de 33 bilhões de dólares americanos, representando um crescimento real nos investimentos feitos, ano a ano, não correspondendo, entretanto, a um aumento proporcional no número de descobertas inovadoras (VIEGAS JR., BOLZANI e BARREIRO, 2006).

2.2.1.1. O ressurgimento dos produtos naturais como fonte de novos fármacos

Sabendo que a diversidade estrutural é fundamental à pesquisa para os diferentes alvos, a comunidade científica volta os estudos para os produtos naturais, pois consideram que “durante os milhões de anos da evolução biológica a seleção natural realizou um processo de química combinatória inigualável” (OLIVEIRA e BRAGA, 2003). A variedade e a complexidade das micromoléculas que constituem os metabólitos secundários de plantas ainda são inalcançáveis por métodos laboratoriais. Estas seriam a consequência direta de milhões de anos de evolução, atingindo um refinamento elevado de formas de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e predadores (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Ainda que a biologia molecular, as químicas, combinatória e computacional e os avanços na pesquisa de genomas ofereçam alternativas viáveis à produção de novos medicamentos, as espécies vegetais ainda constituem uma estratégia para a inovação e competitividade do setor farmacêutico. Cabendo aqui destacar, a singularidade estrutural de suas substâncias, a efetividade terapêutica e as expectativas de patenteabilidade devido às parcerias científicas entre a indústria farmacêutica e instituições de ensino e pesquisa (OLIVEIRA e BRAGA, 2003).

2.2.2. Procedimentos gerais para a obtenção de princípios ativos de origem vegetal

Apesar de uma espécie vegetal poder possuir centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. Assim, qualquer investigação química de uma dada planta, revelará apenas um reduzido espectro de seus constituintes (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998; 2001).

Segundo Falkenberg, Santos e Simões (2007), a pesquisa fitoquímica visa conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou determinar a sua presença. De acordo com estes autores, quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes presentes na mesma. A química de produtos naturais tem, portanto, o objetivo de

esclarecer e registrar os constituintes do metabolismo secundário, através do isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares possibilitando a sua síntese, modificação ou extração de forma mais eficiente (NIERO *et al.*, 2003; MATOS, 1988; e DI STASI, 1996).

Considerando que os compostos que apresentam melhores efeitos biológicos, geralmente, são os que estão presentes em menor proporção na planta, a análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa. Havendo, para tanto, a necessidade de um trabalho integrado entre químicos e farmacólogos para a análise dos extratos semi-puros, frações e dos compostos puros obtidos. Desta forma, para se obter substâncias puras dotadas de efeitos biológicos, são requeridos, além da dedicação e da determinação dos pesquisadores, uma ampla colaboração multidisciplinar (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998; CECHINEL FILHO e YUNES 2001; HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991).

Diante da ampla diversidade química vegetal, surge a necessidade de se utilizar métodos de extração que sejam seletivos, funcionando como verdadeiros filtros das distintas classes de compostos (NIERO *et al.*, 2003). A Fig. 1 ilustra algumas etapas básicas que podem ser seguidas quando se procura obter princípios ativos de plantas. O fundamento básico deste procedimento consiste no fato de que toda substância, independente de sua proporção na planta, e de ser conhecida ou não, pode ser um princípio ativo (CECHINEL FILHO e YUNES, 2001).

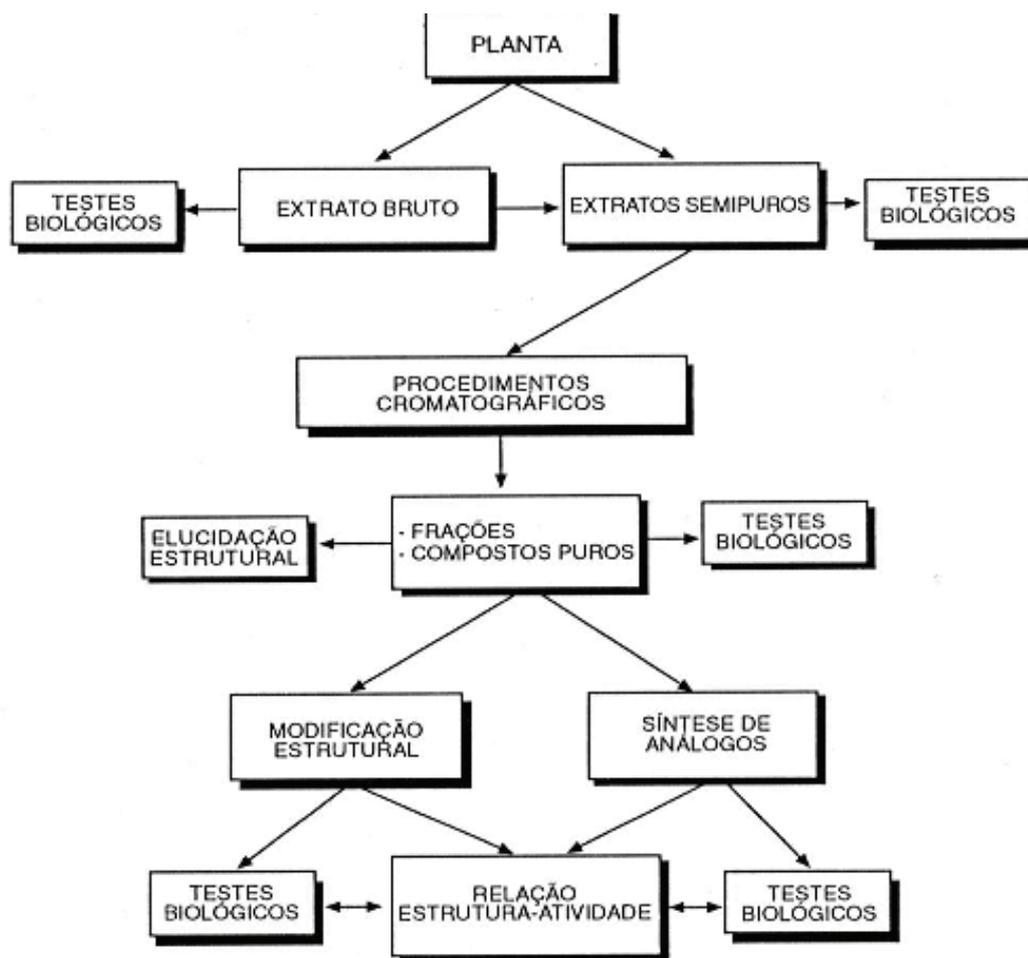


Fig.1. Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos.
Fonte: Cechinel Filho e Yunes (2001)

2.2.3. Seleção de espécies vegetais

A escolha da planta a ser estudada nem sempre é uma tarefa fácil devido à variedade de espécies existentes, porém dependendo do objetivo do estudo pode-se fazer uma escolha orientada (NIERO *et al.*, 2003). Conforme ilustra a literatura, esta orientação pode ser feita por meio das várias abordagens, dentre elas, três tipos são alvos de maiores investigações: a) a abordagem randômica, na qual a escolha da planta é feita sem qualquer critério, tendo como fator determinante a disponibilidade da mesma; b) a abordagem quimiotaxonômica ou filogenética, onde a seleção da espécie está correlacionada com a ocorrência de uma classe química de substâncias presentes em um gênero ou família e c) a abordagem etnofarmacológica, onde a seleção da espécie é feita de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico (BRAZ FILHO, 1994;

ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006; MACIEL *et al.*, 2002). Neste contexto, as probabilidades de novas descobertas de substâncias inéditas, bioativas ou não, é sem dúvida, maior na seleção randômica, porém a seleção etnofarmacológica, fornece maior probabilidade de descoberta de novas substâncias bioativas. Dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular, do que em plantas escolhidas ao acaso. Cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular (CECHINEL FILHO, 2000; CECHINEL FILHO e YUNES, 1998). A pesquisa etnobotânica enfoca dois fatores fundamentais: coleta e utilização medicinal da planta. O primeiro fator implica na região, época e estágio de desenvolvimento preferido para coleta e envolve também, procedimentos especiais, como preparo de exsicatas. Dentro deste contexto, uma vez definida a espécie vegetal a ser estudada, define-se também o local da coleta, de acordo com a origem da mesma: floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal, caatinga, manguezal, entre outros. Num projeto que interligue a fitoquímica com a farmacologia deve-se escolher para coleta a parte da planta que é utilizada na medicina popular. Devendo a avaliação farmacológica de extratos brutos, frações e substâncias isoladas seguir rigorosamente as indicações terapêuticas empíricas divulgadas por estudos etnobotânicos. A seleção correta de testes biológicos específicos permitirá uma avaliação do uso terapêutico da espécie vegetal, fornecendo também, informações sobre a toxicidade da planta (MACIEL *et al.*, 2002).

Também é importante salientar que a planta selecionada deve ser seguramente identificada por um botânico ou um técnico especializado em taxonomia (MACIEL *et al.*, 2002; FERRI, 1996). A falta de identificação científica, ou uma identificação errônea, poderá anular todo o trabalho realizado pelo químico, tornando-o impublicável. Para evitar enganos com a espécie que está sendo estudada, recomenda-se o depósito de exsicatas em herbário credenciado (MACIEL *et al.*, 2002).

Vale ainda ressaltar, que a composição química de uma espécie vegetal, na maioria dos casos, difere significativamente nos diferentes órgãos da planta e também em relação às distintas regiões onde a planta se desenvolve. Outros fatores que também poderão causar modificações nos teores dos constituintes químicos são o clima, o tipo de solo, a época de coleta, entre outros. Dessa forma, são de grande importância a determinação da data e as características do local da coleta (MATOS, 1988; CECHINEL FILHO e YUNES, 1998; MACIEL *et al.*, 2002).

2.2.4. Preparo dos extratos vegetais

O preparo de extratos brutos das plantas é o ponto de partida para um posterior isolamento e purificação (MATOS, 1988; NIERO *et al.*, 2003). Existem várias metodologias descritas para a preparação de extratos vegetais, visando o isolamento de seus constituintes químicos (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998), dentre elas, encontram-se a extração por meio de extrator de Soxhlet, a percolação e a maceração, entre outras. Se o objetivo do estudo for pesquisar constituintes voláteis, inicia-se a extração pela destilação por arraste a vapor (FERRI, 1996; NIERO *et al.*, 2003). A escolha de um determinado método de extração vai depender da consistência dos tecidos vegetais a extrair, da quantidade de água presente, bem como do tipo de substância que se deseja isolar (FERRI, 1996). Importante considerar que o processo de extração pode influenciar consideravelmente os resultados do estudo experimental (MATOS, 1988; FERRI, 1996). Também os solventes devem ser escolhidos de acordo com os objetivos do estudo (MATOS, 1988; FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 2007), considerando-se que devem ser o mais seletivo possível. Como a seletividade depende da polaridade, o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se pretende extrair determinará o solvente ou mistura destes, que mais se aproxima do ótimo de seletividade para aquela extração. Em análises fitoquímicas, quando não se conhece o conteúdo do material a ser estudado, costuma-se submetê-lo a sucessivas extrações, com solventes de polaridades crescentes. Consegue-se, dessa forma, uma extração fracionada, onde as diferentes frações contêm compostos de polaridade também crescente (FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 2007).

Dentre as várias técnicas existentes, o preparo de extratos deve, preferencialmente, ser feito a frio por percolação, pois apesar do grande volume de solvente utilizado, neste processo minimizam-se os riscos provocados pela ação combinada do calor, luz e solvente na formação de artefatos (MATOS, 1988; FERRI, 1996; MACIEL *et al.*, 2002). Pela mesma razão, a concentração dos extratos deve ser feita sob pressão reduzida, o que também diminui o tempo de recuperação do solvente (MATOS, 1988). A opção da utilização de extrator de Soxhlet, por ser um método de extração a quente, apresenta maior risco de reações químicas, na formação de artefatos (MATOS, 1988; MACIEL *et al.*, 2002). Compostos que se comportam como ácidos ou base lipossolúveis são extraídos, preferencialmente, utilizando-se suas propriedades de formarem sais hidrossolúveis com bases inorgânicas, no caso dos ácidos e como ácidos inorgânicos, no caso das bases

inorgânicas (MATOS, 1988; FERRI, 1996). A extração de constituintes químicos de plantas pode também envolver processos de partição entre solventes aquosos ácidos ou básicos e solventes orgânicos imiscíveis com água tais como, éter, clorofórmio, acetato de etila (MACIEL *et al.*, 2002; FERRI, 1996).

Para mais de uma extração, usualmente utilizam-se três tipos de solventes: um apolar, como hexano ou éter de petróleo, um de polaridade moderada, como o clorofórmio e o diclorometano e um polar, como, por exemplo, o metanol e o etanol (MACIEL *et al.*, 2002). Um método alternativo para obtenção de extratos consiste em macerar a planta em estudo durante vários dias diretamente com solventes de polaridade crescente (NIERO, 1993; CECHINEL FILHO e YUNES, 2001), conforme o exemplo indicado na Fig. 2.

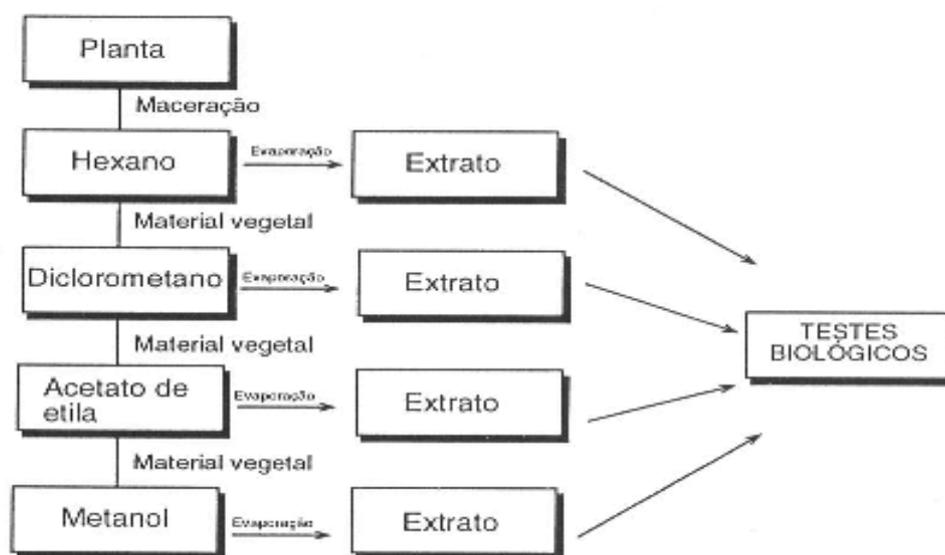


Fig. 2. Esquema geral para obtenção de extratos diretamente da planta
Fonte: Cechinel Filho e Yunes, (1998)

2.2.5. Fracionamento, purificação e identificação dos constituintes químicos

Para uma única extração, a frio ou a quente, usa-se geralmente um solvente polar (MACIEL *et al.*, 2002), neste caso, o solvente mais adequado para obtenção do extrato bruto é o metanol, pois possibilita a extração de um maior número de compostos. Na seqüência, este extrato deve ser submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes (MIGUEL, 1987; FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 2007), como hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, visando uma semipurificação das

substâncias através de suas polaridades. Outros solventes de polaridades similares também podem ser utilizados (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

A semipurificação de extratos também pode ser feita por meio de outra metodologia que consiste na filtração de extratos alcoólicos (metanol ou etanol) brutos em sílica gel com solventes de polaridades crescentes, ocorrendo também uma separação das substâncias pela polaridade (MATOS, 1988; CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

Considerando que a extração de constituintes de uma planta é um exercício de erros e acertos, onde se utiliza diferentes solventes e condições variadas, o sucesso ou fracasso do processo poderá ser observado posteriormente nos processo de purificação (NIEIRO *et al*, 2003).

Quando se objetiva localizar os princípios ativos, todos os extratos semipuros devem ser testados e aquele que apresentar efeito biológico de interesse, deverá ser submetido aos procedimentos cromatográficos para o isolamento e a purificação dos compostos (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998; FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 2007). Uma vez extraído da planta, o composto bioativo deve ser separado do extrato bruto. Para isso, os procedimentos podem envolver desde uma simples cristalização do composto até separações sucessivas com partições em solventes com polaridades crescentes e extensivas técnicas cromatográficas (HOUGHTON e RAMAN, 1998; NIEIRO *et al*, 2003).

Neste contexto, a cromatografia ocupa um lugar de merecido destaque no que concerne à separação, identificação e quantificação de compostos. Compreende um grupo diversificado de procedimentos que permite separar componentes muitos semelhantes, de misturas complexas, onde a amostra é transportada por uma fase móvel que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico (SKOOG, 2002). Este método serve também para fins de identificação e análise de misturas e de substâncias isoladas recebendo, neste caso, a denominação de cromatografia analítica, enquanto a que visa ao isolamento de compostos é denominada cromatografia preparativa. A fase estacionária pode encontrar-se empacotada em coluna, que pode ser aberta ou fechada, ou constituir uma superfície plana, como na cromatografia em papel e em camada delgada (FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 2007).

Vale ressaltar, que as características particulares de cada composto, como polaridade, acidez e tamanho molecular, entre outros, devem ser levados em consideração. Além disso, para prover compostos com o grau de pureza desejável às análises estruturais, a

purificação final dos mesmos pode ser acompanhada por técnicas como recristalização, sublimação ou destilação (NIEIRO *et al.*, 2003).

Técnicas utilizando mais de um instrumento de análise, também chamadas de hífenadas estão surgindo e vêm permitindo extração e análises de forma mais seletiva e complementar gerando uma grande quantidade de informações. São exemplos destas análises as combinações: cromatografia líquida – ultravioleta - ressonância magnética nuclear (CL-UV-RMN), cromatografia líquida – espectrofotômetro de ultravioleta – espectrometria de massa (CL-UV-EM), cromatografia líquida – espectrometria de massa – espectrometria de massa (CL-EM-EM), as quais fornecem maiores detalhes estruturais, como características dos fragmentos (NIEIRO *et al.*, 2003). Estas combinações permitem direcionar as operações de fracionamento para o isolamento dos compostos considerados de maior interesse em função dos dados espectrais obtidos (FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 2007).

Para a elucidação estrutural, atualmente, são empregados métodos físicos de análise como a espectrometria de massa, a espectroscopia no UV, no visível e no infravermelho, bem como a RNM ^1H e ^{13}C . A interpretação de cada um destes espectros pode fornecer informações qualitativas e quantitativas a respeito da estrutura da substância analisada (FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 2007). Geralmente é o uso em conjunto destas técnicas espectrais, aliado ao uso de técnicas sofisticadas de RMN (NOE, COSY, HETCOR, INADEQUATE, entre outras) que tem permitido propor com segurança a estrutura molecular da substância desconhecida (CECHINEL FILHO e YUNES, 2001; FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 2007). Outro método possível para a avaliação da estereoquímica real destas substâncias é o uso de difração de raios-X (CECHINEL FILHO e YUNES, 2001).

2.3. Importância das Plantas Medicinais na Terapêutica Atual

Os compostos de origem natural, de acordo com Robbers, Speedie e Tyler (1997), podem desempenhar quatro diferentes papéis na medicina moderna: 1º). Pela dificuldade ou mesmo impossibilidade em obter sinteticamente moléculas com a mesma estereoquímica, alguns fármacos permanecem sendo obtidos a partir de matérias-primas vegetais. Entre estes se encontram os mais diversos grupos de substâncias, como por exemplo, os alcalóides da papoula produtora de ópio, do esporão do centeio e das espécies de solanáceas, além dos glicosídeos cardiotônicos da digital, entre outros (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997;

SCHENKEL, GOSMAN e PETROVICK, 2007). O Quadro 1 mostra uma lista ilustrativa de fármacos com importância terapêutica atual, obtidos exclusivamente de matérias primas vegetais (SCHENKEL, GOSMAN e PETROVICK, 2007).

2º). Também de fonte natural são retirados compostos básicos que podem ser ligeiramente modificados para tornarem-se mais eficazes ou menos tóxicos, como ocorre com as numerosas variações da molécula de morfina, assim como muitos outros narcóticos usados como analgésicos (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997).

3º). Apresentam utilidade como protótipos ou modelos para medicamentos sintéticos que tenham atividades semelhantes às dos originais (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997). Em muitas situações, conforme ressaltam Schenkel, Gosman e Petrovick (2007), a descoberta da atividade destas substâncias deu origem à identificação de uma nova possibilidade de intervenção terapêutica, não representando, portanto, apenas o surgimento de um novo grupo de substâncias. Ilustrando esta categoria, vale lembrar que antes do isolamento e estudo da atividade da cocaína, tubocurarina e atropina, não se conheciam anestésicos locais, bloqueadores musculares e anticolinérgicos, respectivamente. O Quadro 2 mostra exemplos destes compostos e suas relações (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997).

Quadro 1. Alguns fármacos obtidos exclusivamente de matérias-primas vegetais.

Fármaco	Classe terapêutica	Espécie vegetal
Artemisina	Antimalárico	<i>Artemisia annua</i> L.
Atropina	Anticolinérgico	<i>Atropa beladonna</i> L.
Capsaicina	Anestésico tópico	<i>Capsicum</i> spp.
Colchicina	Antirreumático	<i>Colchicum autumnale</i> L.
Digoxina, digitoxina	Glicosídeos	<i>Digitalis purpúrea</i> L. e <i>D. lanata</i> Ehrhart
Escopolamina	Antiparkinsoniano	<i>Datura</i> spp.
Emetina	Antiamebiano	<i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes
Morfina, codeína	Analgésico,	<i>Papaver somniferum</i> L.
Pilocarpina	Antiglaucômato	<i>Pilocarpus jaboradi</i> Holmes
Quinina	Antimalárico	<i>Cinchona</i> spp.
Reserpina	Anti-hipertensivo	<i>Rauwolfia</i> spp.
Vimblastina,	Antitumorais	<i>Cantharanthus roseus</i> (L.) G. Don

Quadro 2. Exemplos de substâncias obtidas de plantas que funcionam como protótipo ou modelo para outros medicamentos.

Substância natural (atividade)	Derivado semi-sintético	Derivado sintético do produto natural
Atropina (anticolinérgico)	Homatropina	Glicopirrolato
Cocaína (anestésico local)	-	Procaína
Efedrina (adrenomimético)	Fenilpropanolamina	Tetrahidrozolina
Morfina (analgésico narcótico)	Hidromorfona	Propoxifeno
Fisostigmina (colinérgico)	-	Neostigmina
Salicilina e Ácido Salicílico	Ácido	Ibuprofeno

Grande parte dos adjuvantes farmacêuticos empregados atualmente é de origem vegetal, conforme mostra o Quadro 3. A compreensão do modo de ação destes compostos levou à descoberta de derivados semi-sintéticos, aonde foram evidenciadas, através de modificações estruturais, algumas propriedades das moléculas originais, como ocorre nos derivados da celulose (SCHENKEL, GOSMAN e PETROVICK, 2007).

4º). Em muitas outras situações em que a obtenção de fármacos que não ocorrem na natureza ou que ocorrem em pequena quantidade, pôde ser facilitada ou tornou-se economicamente viável, apenas a partir da descoberta de substâncias que puderam ser usadas como precursoras na sua síntese (SCHENKEL, GOSMAN e PETROVICK, 2007). Estas atividades podem ser modificadas por métodos químicos ou biológicos, para produzir drogas potentes, não obtidas facilmente por outros métodos (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997). Como exemplo deste grupo pode-se citar o caso dos anticoncepcionais hormonais, preparados a partir de matérias-primas vegetais de onde se extraem substâncias esteróidas como a diosgenina e solasodina ou a partir de esteróides como o estigmaterol (SCHENKEL, GOSMAN e PETROVICK, 2007). Outro exemplo é o tratamento químico e biológico do estigmaterol, presente em abundância no óleo de soja, para produzir, em larga escala a hidrocortizona ou corticosteróides afins, que ocorrem em pequenas quantidades na natureza. Nesta categoria encontra-se também o taxol que pode ser sintetizado a partir da bacatina III, que é mais ou menos abundante nas folhas de várias espécies de teixo, enquanto o próprio taxol é encontrado apenas na casca do teixo raro do Pacífico. O valor dos produtos naturais como precursores de medicamentos importantes é incalculável (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997). O Quadro 4 ilustra, sumariamente, esta categoria (SCHENKEL, GOSMAN e PETROVICK, 2007).

Quadro 3. Alguns adjuvantes farmacêuticos de origem vegetal

Adjuvante	Função principal	Fonte vegetal
Amido e derivados	Aglutinante, desagregante	<i>Zea mays</i> L., <i>Solanum tuberosum</i> L.
Celulose e derivados	Aglutinante, desagregante, formador de gel, espessante, filmógeno, modificador da cedência	<i>Pinnus</i> spp., <i>Eucalyptus</i> spp.
Óleos fixos	Veículo	<i>Arachys hypogaea</i> L., <i>Olea europaea</i> L.
Óleos voláteis	Adequadores e corretivos organolépticos	<i>Citrus</i> spp., <i>Mentha</i> spp.
Cera de carnaúba	Excipiente de formas farmacêuticas semi-sólidas	<i>Copernicia prunifera</i> (Miller) H. E. Moore
Esteviosídeo	Edulcorante	<i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) Bertoni
Sacarose	Edulcorante, estruturador de xaropes, material de cobertura de drágeas	<i>Saccharum officinarum</i> L.
Etanol	Veículo	<i>Saccharum officinarum</i> L.
Goma guar, Goma caraia	Aglutinantes, formadores de gel, espessantes	<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> Taub. <i>Sterculia tormentosa</i> Guill. et Perr.
Ácido algínico e derivados	Aglutinantes, formadores de gel, espessantes	<i>Fucus vesiculosus</i> L.
Pectinas	Aglutinantes, formadores de gel, espessantes	<i>Citrus</i> spp.
Manteiga de cacau	Base de supositórios	<i>Theobroma cacao</i> L.

Quadro 4. Algumas matérias-primas vegetais usadas na semi-síntese de fármacos

Matéria-prima	Fármacos	Espécies vegetais
10-desacetilbacatina III	Paclitaxel, docetaxel	<i>Taxus</i> spp.
Diosgenina	Hormônios esteroidais	<i>Dioscorea</i> spp.
Hecogenina	Hormônios esteroidais	<i>Agave</i> spp.
Podofilotoxina	Etoposídeo, teniposídeo	<i>Podophyllum</i> spp.
Escopolamina	N-butilescopolamina	<i>Datura</i> spp.
Estigmasterol	Hormônios esteroidais	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.
Catarantina, vindolina	Vimblastina, vinorelbina	<i>Cantharanthus roseus</i> (L.) G. Don

Analisando todas as fases do desenvolvimento da química de plantas medicinais, pode-se evidenciar sua importância, não só como embasamento científico de uma medicina alternativa, mas como fonte de novos potentes fármacos (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001). Os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica, seja por si mesmo, seja como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997). O sucesso terapêutico alcançado por algumas substâncias isoladas de plantas medicinais, como o taxol, a artemisinina, a vimblastina, a vincristina, a forskolina, entre outros, estimula a busca cada vez maior por substâncias de origem vegetal para a cura de doenças ainda sem tratamento ou profilaxia adequados (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001).

Neste cenário, o conhecimento dos constituintes fitoquímicos desempenha um papel importante na medida em que com o isolamento, purificação e identificação estrutural de substâncias químicas alimentam a literatura com informações químicas que podem ser utilizadas, após estudos biológicos, como fontes alternativas frente às drogas existentes no mercado, além de fornecer novos modelos de fármacos para química medicinal (BORGES, 2006).

Outro aspecto relevante é a identificação de novas fontes naturais de compostos químicos visando o desenvolvimento de fitofármacos, que podem vir a beneficiar a economia no gerenciamento de suas políticas de saúde. E neste contexto, os produtos naturais obtidos de plantas demonstram ter um valor incalculável para a sociedade contribuindo, significativamente para a melhoria da qualidade de vida da população. (DAVIENNE, RADDI e POZETTI, 2004).

2.4. Importância da validação de plantas medicinais e novos fitoterápicos

Apesar da crescente importância das plantas medicinais e dos medicamentos fitoterápicos no Brasil atual, relativamente poucos estudos foram realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança, sendo muitas plantas ainda utilizadas com base somente em seu uso popular (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). Esta situação é agravada, quando se refere às plantas medicinais da flora nativa que são, na maioria das vezes, consumidas com pouca ou nenhuma comprovação das propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Vale ressaltar, que muitas vezes essas plantas são empregadas, inclusive,

para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas (VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005).

Entre os adeptos da fitoterapia é comum o pensamento de que as plantas medicinais e os fitoterápicos são eficazes e seguros, naturalmente balanceados e sem os efeitos colaterais comuns aos produtos sintéticos, não necessitando, por esta razão, passar pelas avaliações exigidas para estes medicamentos (LAPA *et al.*, 2007). Contudo, segundo o Sistema de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), a falsa concepção de que “medicamento natural, se não fizer bem, mal não faz” vem contribuindo para a estatística brasileira, onde os medicamentos ocupam o primeiro lugar entre os agentes causadores de intoxicações em seres humanos e o segundo lugar, nos registros de mortes por intoxicação, apesar de não existir dados específicos sobre ingestão de plantas medicinais, de forma isolada (FIOCRUZ/CICT/SINITOX, 2006). Diante disso, Veiga Jr., Pinto e Maciel (2005), consideram a toxicidade de plantas medicinais um problema sério de saúde pública.

Diante dessa realidade, é preciso salientar que o uso popular, mesmo o tradicional, não é suficiente para validar eticamente plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros, uma vez que a literatura científica indica que muitas destas plantas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006; AGRA *et al.*, 2008; CAPASSO *et al.*, 2000; CALIXTO, 2000). Dessa forma, deve-se considerar que a planta medicinal utilizada em medicamentos é um xenobiótico, ou seja, um produto estranho introduzido ao organismo humano com finalidades terapêuticas. E como todo corpo estranho, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos e assim devem ser encarados até comprovação contrária (LAPA *et al.*, 2007).

Do ponto de vista toxicológico, deve-se considerar, ainda, que uma planta medicinal ou um fitoterápico não tem somente efeitos imediatos e facilmente correlacionados com a sua ingestão, mas, também, os efeitos que se instalam em longo prazo e de forma assintomática, como os carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos (LAPA *et al.*, 2007). Assim, a avaliação toxicológica deve ter por objetivo classificar toxicologicamente um composto químico, como um fármaco e fornecer informações sobre a forma correta de seu emprego, assim como, esclarecer a respeito das medidas preventivas e curativas, quando do seu uso adequado. Esta avaliação deverá ser feita tendo como base as informações toxicológicas obtidas de experimentos com animais de laboratório, ensaios em microorganismos ou mediante registro de intoxicação ocorrida em seres humanos (SOUZA *et al.*, 2003).

Nesse sentido, o estudo toxicológico pré-clínico preconizado para fitoterápicos não difere daqueles recomendados para qualquer outro xenobiótico, uma vez que a partir do momento em que os fitoterápicos foram definidos como “medicamentos de origem vegetal”, estes passaram a estarem sujeitos à legislação vigente para os medicamentos. Assim sendo, do mesmo modo que os demais medicamentos, além das provas de eficácia, um fitoterápico deve possuir estudos toxicológicos pré-clínicos para orientar com segurança os pesquisadores clínicos sobre as doses em que aparecem efeitos tóxicos em animais de laboratório (BRITO, 1996; LAPA *et al*, 2007).

No Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos anos. Desde 1995, quando estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos, a ANVISA vem elaborando normas para a regulamentação destes medicamentos. Em 2000 publicou a RDC nº 17 e em 16 de março de 2004, determinou à publicação da Resolução RDC nº 48 e da Resolução - RE nº 90, atualmente em vigor, e que tratam do registro dos medicamentos fitoterápicos e apresenta o “Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos”, respectivamente. A RE nº 90 por meio deste guia padroniza os métodos para os estudos de toxicologia pré-clínica, preconiza que os estudos de toxicidade devem ser conduzidos com amostras padronizadas do medicamento fitoterápico ou do derivado vegetal a partir do qual este é produzido e recomenda, ainda, estudos de toxicidade aguda e de doses repetidas. Além disso, sugere também estudos de genotoxicidade, quando houver indicação de uso contínuo (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006; BRASIL, 2000; 2004a; 2004b).

Para Lorenzi e Matos (2002), planta medicinal é medicamento somente quando usada corretamente, isto é, validada e incluída na Farmacopéia e requer, numa condição ideal ter identificado seu princípio ativo ou tê-lo evidenciado farmacologicamente. Para tanto, segundo os autores, os estudos podem ser divididos em duas etapas. Na primeira, são desenvolvidos os estudos farmacológicos, pré-clínicos e toxicológicos, aliados a ensaios clínicos e estudos de toxicologia humana aguda, subaguda e crônica. Na segunda etapa, faz-se o estudo fitoquímico, visando o isolamento e identificação do princípio ativo, por processo de separação biomonitorado.

Considerando que, segundo Di Stasi (2007), o consumo de plantas medicinais no Brasil, de forma legal ou não, é mais que uma questão de opção terapêutica, é uma necessidade para o atendimento primário de saúde, uma vez que, de acordo com Lapa *et al*.

(2007), no país, as plantas e os fitoterápicos delas obtidos são muito utilizados no tratamento das doenças prevalentes. Neste contexto, este autor afirma que uma planta medicinal para ser utilizada como medicamento deve ser previamente validada, ou seja, deve ter sua ação comprovada e sua toxicidade avaliada cientificamente na espécie humana, “como qualquer outro medicamento”.

Isso considerado, as espécies vegetais nativas do Brasil representam uma das maiores potenciais fontes para o desenvolvimento de novos medicamentos e por, essa razão, uma prioridade nacional que pode permitir o desenvolvimento de uma indústria farmacêutica nacional competitiva e com as qualidades necessárias para a produção de medicamentos seguros e eficazes (DI STASI, 2007).

2.5. Plantas Medicinais do Cerrado

A grande diversidade de plantas que cobre a extensa área territorial do Brasil é formada por seis complexos ecossistemas, entre os quais se encontra o cerrado, segundo maior bioma do país, identificado como um dos mais distintos biomas sul-americanos (RODRIGUES e CARVALHO, 2001; SILVA, 2008). Considerado por Proença *et al.* (2000), o mais brasileiro dos biomas sul-americanos, pois, excetuando-se algumas pequenas áreas na Bolívia e no Paraguai, ele está totalmente inserido em território nacional.

Ocupando uma área de aproximadamente dois milhões de km², correspondente a cerca de 23% do território nacional, estende-se, predominantemente, na região Centro-Oeste onde ocupa o Planalto Central Brasileiro (RODRIGUES e CARVALHO, 2001). Encontra-se vegetação de cerrado nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Maranhão, Piauí, Roraima e Rondônia, e no Distrito Federal (EITEN, 1990), conforme ilustra a Fig. 3 [WORLD WILDLIFE FUND – BRASIL- (WWF-BRASIL), 2009].



Fig. 3. Mapa do Bioma Cerrado Brasileiro
Fonte: www.wwf.org.br

Entende-se por cerrado ou savana tropical, um tipo de cobertura vegetal bastante característico, composto por uma vegetação rasteira, constituída principalmente por gramíneas, coexistindo com arbustos e árvores esparsas, baixos, tortuosos de casca grossa, folhas largas e sistema radicular profundo (RODRIGUES e CARVALHO, 2001).

Nos Cerrados, a biomassa subterrânea é maior do que a biomassa aérea, enquanto a densidade da vegetação varia bastante. Na busca de água e de elementos minerais nutritivos, as raízes das plantas deste bioma podem atingir profundidades superiores a dez metros. Outras estratégias de adaptação aos períodos de seca, como germinação de sementes na época das chuvas e pronunciado crescimento radicular nos primeiros estágios de desenvolvimento das plantas, também podem ser observadas nesta vegetação (ASSAD, 1999).

Detentor de grande diversidade biológica, este bioma é apontado como sendo a formação savânica com maior diversidade vegetal do mundo, especialmente quando se consideram as espécies lenhosas (GUARIM NETO e MORAIS, 2003). Estima-se que o Cerrado contribui com 10.000 espécies de plantas das 60.000 fanerógamas distribuídas pelo país (RODRIGUES e CARVALHO, 2001). O Cerrado é ainda, visto como “celeiro do mundo” ou “área de expansão da fronteira agrícola” (EMPRAPA CERRADOS, 1999).

Sendo uma vegetação que ocupa um quinto do território brasileiro e situada em regiões de maior desenvolvimento do Brasil Central, é natural que as espécies que compõem

essa vegetação exerçam forte influência na medicina popular (RODRIGUES e CARVALHO, 2001; RIBEIRO e WALTER, 1998). Porém sua diversidade é pouco conhecida e estudada, principalmente quando comparada ao que se dispõe sobre a Amazônia e Mata Atlântica, havendo, ainda carência de estudos voltados para a identificação de suas plantas úteis, especialmente quando comparada à diversidade e à área ocupada (BRASIL, 1999). O desconhecimento de sua riqueza e potencialidades pode ser observado quando se verifica que cerca de 40% do bioma já tenha sido devastado, em consequência de projetos nacionais e multinacionais, que visam às atividades de agricultura e pecuária, sem levar em consideração a relação alimentícia e medicinal que essa vegetação exerce junto às camadas mais carentes do interior do Brasil, além das consequências edáficas e climáticas provenientes do manejo inadequado (RATTER, RIBEIRO e BRIDGEWATER, 1997; RODRIGUES e CARVALHO, 2001).

Além disso, o Cerrado, diferentemente da Amazônia, Mata Atlântica e Pantanal, não recebeu da Constituição Federal o *status* de "Patrimônio Nacional", tornando a conservação de sua biodiversidade uma tarefa mais difícil (WWF-BRASIL, 2009). Somente 1,5% de sua extensão estão protegidas por lei, nas diversas categorias de conservação, sendo atualmente a vegetação em maior risco no país (MAURY, 2002; GUARIM NETO e MORAIS, 2003; KAPLAN, FIGUEIREDO e GOTTLIEB, 1994). Outro dado preocupante, segundo WWF-Brasil (2009), é que cerca de 80% do carvão vegetal consumido no Brasil vem das árvores do Cerrado.

Em vista disto, é preciso valorizar os recursos que ela oferece que estão sob forte pressão de extinção e, uma vez extintos, estarão indisponíveis às futuras gerações (KAPLAN, FIGUEIREDO e GOTTLIEB, 1994). Entre estes, deve-se considerar o recurso terapêutico oferecido pelas plantas medicinais, que justificaria a utilização das plantas de forma sustentável, para conservação e reparação das áreas degradadas (GUARIM NETO e MORAIS, 2003; KAPLAN, FIGUEIREDO e GOTTLIEB, 1994; YUNES e CECHINEL FILHO, 2001).

Neste contexto, o Cerrado brasileiro foi considerado um *hotspot* mundial - considera-se *hotspot* toda área prioritária para conservação, devido à ameaça de extinção, no mais alto grau, com pelo menos 1500 espécies endêmicas de plantas e que tenha perdido mais de $\frac{3}{4}$ de sua vegetação original. Considerando que a biodiversidade não está igualmente distribuída no planeta, em 1988 o ecólogo inglês Norman Myers criou o conceito *hotspot* para resolver um dos maiores dilemas dos conservacionistas, que era determinar quais as áreas

mais importantes para a preservação da biodiversidade na Terra. Hoje estas áreas correspondem a apenas 2,3% da superfície terrestre, onde se encontram 50% das plantas conhecidas. Dos 34 *hotspots* atualmente listados, dois se encontra no Brasil: a Mata Atlântica e o Cerrado (RHODIN, 2009).

Um exemplo desta situação foi verificado no estado do Paraná em 1995, onde em função da destruição de habitats naturais, pôde-se observar o desaparecimento quase total de algumas espécies vegetais da região de cerrado. Estes dados, diagnosticados através de levantamento realizado pelo IBAMA e Governo do Estado, resultou no lançamento da lista das “Plantas Medicinais Ameaçadas de Extinção” naquele estado, onde, a espécie *C. regium*, aparece na categoria “em perigo”. Como consequência, esta foi a primeira espécie escolhida para ser trabalhada pelo projeto “Flora Ameaçada”, sob a coordenação dos pesquisadores do Instituto Ambiental do Paraná (IAP). Assim, realizou-se um estudo sobre a germinação e multiplicação da espécie visando sua reintrodução nas áreas de cerrado do Paraná, uma vez que a mesma havia praticamente desaparecido da região (NOGUEIRA *et al.*, 1998). Também na região centro-oeste, um estudo sobre o extrativismo de plantas medicinais no cerrado, resultou numa lista de espécies consideradas de alta prioridade para conservação e domesticação e, mais uma vez, a *C. regium* foi incluída (VIEIRA *et al.* 2002).

Segundo Skorupa e Vieira (2005) na região de cerrado, a diversidade de pastadores é maior, dessa forma, as plantas produzem por diferentes rotas metabólicas, uma quantidade maior de metabólitos secundários, tais como, alcalóides, terpenóides, flavonóides, entre outros, que exercem importante papel na proteção das mesmas contra o meio em que vivem. Estes compostos produzidos pelas diferentes espécies, chamadas de *plantas medicinais*, uma vez isolados e identificados passam a fazer parte do arsenal terapêutico e constituem, segundo Silva (2008), uma importante fonte de moléculas vegetais inovadoras para diversas condições patológicas, incluindo as doenças infecciosas.

Gottlieb e Borin (1994) consideram que há possivelmente, mais espécies vegetais, ou seja, maior diversidade específica, em áreas amostrais de Floresta Amazônica do que nas de Cerrado de mesmo tamanho, salientando, porém que a diversidade taxonômica é certamente muito maior neste último. Esta diversidade é relativa aos táxons mais elevados, como gênero, família e ordem, mostrando, dessa forma, a importância do Cerrado para pesquisas com plantas medicinais. Visto que, quanto maior a diversidade taxonômica em níveis superiores, maior é o distanciamento filogenético entre as espécies e, portanto, maior será a diferença e diversidade química entre elas. Dessa forma, a gama e o potencial de

compostos bioativos produzidos pelas espécies do Cerrado seriam maiores que as da Floresta Amazônica. Este fato foi evidenciado por Kaplan, Figueiredo e Gottlieb (1994) que constataram que se utilizando o mesmo método de extração fitoquímica, há diferenças muito contrastantes entre elas. As espécies de Mata Atlântica apresentam pequeno número de compostos em grandes quantidades, enquanto que as plantas do Cerrado possuem grande número de compostos estreitamente relacionado, mas em quantidades tão pequenas que só poderiam ser identificados por análise espectral. Por essas características, consideram que o bioma Cerrado deveria ser considerado como área prioritária para pesquisas com plantas medicinais e conservação de recursos naturais.

Considerando que de acordo com Santana e Lacerda (2008), uma das áreas mais preservadas do bioma Cerrado encontra-se no estado do Tocantins, vale lembrar, Silva, (2008) que recomenda a realização de estudos que comprovem a atividade de princípios ativos, a fim de explorar o potencial medicamentoso da diversidade química do Cerrado e a luta contra o desmatamento agressivo desse bioma.

2.6. A PLANTA *Cochlospermum regium*

2.6.1. Aspectos botânicos

2.6.1.1. Características da Família Bixaceae

Descrita por Karl Sigismund Kunth a família Bixaceae foi subordinada à ordem Bixales e incluía apenas o gênero *Bixa*. Atualmente esta família esta subordinada à ordem Malvales, subclasse Dilleniidae e inclui além do gênero *Bixa*, os gêneros *Amoreuxia* e *Cochlospermum*, anteriormente pertencentes à família Cochlospermaceae (DI STASI, 2002). Segundo Ritto e Kato (1998), Cronquist, também considerou a família Cochlospermaceae Engler como parte da família Bixaceae Kunth, não constituindo, portanto, uma família autônoma. Apesar dos relacionamentos óbvios entre *Cochlospermum* e *Bixa* que têm levado muitos autores a agrupá-los em uma única família, muitos ainda tratam a família Cochlospermaceae separadamente da Bixaceae, compreendendo os seus dois gêneros *Cochlospermum* e *Amourexia*, que são encontrados nas regiões tropicais de todo mundo, especialmente nas Américas e na África (POPPENDIECK, 2003; RITTO e KATO, 1998; JOLY, 2002; BARROSO *et al.*, 2002).

As plantas desta família são arbóreas ou arbustivas e produz um suco alaranjado ou vermelho em suas células secretoras, característica marcante da família. Folhas alternas caracteristicamente trilobadas, com estípulas, longamente pecioladas, alternas, palmadas ou compostas-digitadas; caducas, margem serrilhada ou inteira. Possuem flores andróginas vistosas, de coloração amarela, pentâmeras, diclamídeas, com simetria radial, dispostas em panículas terminais paucifloras, com brácteas e bractéolas. Androceu formado por numerosos estames, abrindo-se por poros apicais. Ovário súpero com três a cinco carpelos, numerosos óvulos, um só lóculo e placentação parietal. Sementes ricamente pilosas, com longos pêlos brancos, unicelulares. Fruto seco, capsular loculicida. As espécies do cerrado podem apresentar um grosso xilopódio (JOLY, 2002; BARROSO *et al.*, 2002; DI STASI, 2002; SIB - FdP, 2007).

A esta família têm sido reportados vários usos medicinais, tais como: gastrite, queimaduras, indigestão, abscessos, febres e icterícia. Entre seus principais constituintes fitoquímicos encontram-se os flavonóides, dentre os quais incluem o kaempferol, quercetina, miricetina e ácido elárgico, sendo que somente este último está presente em *Bixa*.

O gênero *Bixa*, possui quatro espécies, todas conhecidas no Brasil como Urucum e que reúnem importante valor econômico, além de suas propriedades medicinais. O gênero *Amoreuxia* está principalmente distribuído no México, ocorrendo, no entanto, alguns raros exemplares na América do Sul e Oeste da Índia e apresenta sua flor com simetria caracteristicamente zigomórfica, enquanto que o gênero *Cochlospermum* é pantropical (Fig. 4) e possui simetria actinomórfica, constituindo esta simetria, a principal diferença entre estes dois gêneros (POPPENDIECK, 2003).

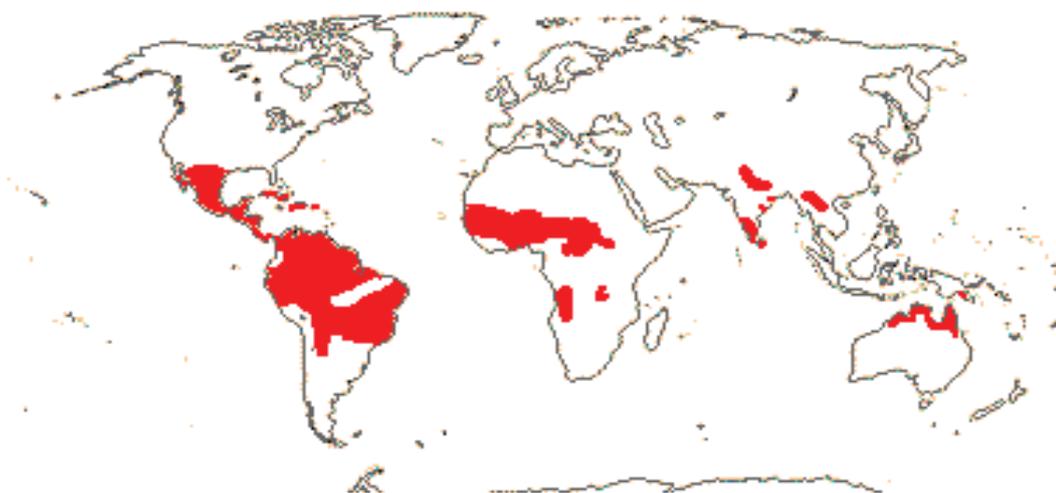


Fig. 4. Mapa de distribuição geográfica do gênero *Cochlospermum*
Fonte: Poppendieck, 1981. [Photo - Habit, Flower.]

O gênero *Cochlospermum* Knuth é composto de 12 espécies, representado no Brasil por aproximadamente quatro espécies presentes nos campos cerrados, onde recebem o tradicional nome de algodão-do-campo e pacotê, no Nordeste (POPPENDIECK, 2003; BARROSO *et al.*, 2002; JOLY, 2002). Este gênero é constituído de árvores, arbustos ou subarbustos com tronco subterrâneo lenhoso, flores actinomorfas, cápsula com 3-5 carpelos, sementes reniformes a espiraladas, com longos pêlos finos (POPPENDIECK, 2003). Folhas palmatilobadas e serrilhadas em *C. regium* ou arbustos com folhas compostas-digitadas e inteiras em *C. tetraporum*. (SIB - FdP, 2007).

Várias atividades farmacológicas foram atribuídas ao gênero *Cochlospermum*, entre as quais se observa a atividade hepatoprotetora, anti-malárica, antibacteriana, antitumoral, anti-viral, desintoxicante, anti-leishmania, antihipertensiva e antidiabética, doenças gastrointestinais, shistosomose e diarreia (NEGARD *et al.*, 2005, DIALLO *et al.*, 1992; DIALLO *et al.*, 1989; DIALLO, VANHAELEN e HIKINO, 1987; DIALLO E VANHAELEN, 1987; PRESBER *et al.*, 1992; PRESBER *et al.*, 1987; ALIYU, OKOYE e SHIER, 1995; SÁNCHEZ-SALGADO *et al.*, 2007; BENOIT-VICAL, 1999; BENOIT *et al.*, 1995; ANTHONY, FYFE e SMITH, 2005; VONTHRON-SÉNÉCHEAU *et al.*, 2003; BENOIT-VICAL *et al.*, 2003; SOH e BENOIT-VICAL, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 1994; BRUM *et al.*, 1997; VINOD *et al.*, 2008).

A partir de levantamento bibliográfico, Almeida *et al.* (2005) concluíram que os óleos essenciais de algumas espécies deste gênero têm se mostrado ricos em sesquiterpenos e cetonas alifáticas de cadeia longa. E entre os constituintes químicos mais frequentemente isolados, citaram os triacilbenzenos e os flavonóides.

Dentre os flavonóides isolados das plantas que compõe o táxon *Cochlospermum* foram identificados a miricetina, a quercetina, o ácido arjunóico, a aromadendrina, o kampferol, a naringenina e a apigenina, nas formas livres ou combinadas formando os glicosídeos naringenina 7-O-glucosídeo, apigenina 7-O-glucosídeo, 5,7,4'-trihydroxy-flavan-3-ol e dihidrokaempferol 3-O-glucopiranosídeo, entre outros (DIALLO *et al.*, 1992; LIMA *et al.*, 1995; ALMEIDA *et al.* 2005; SÁNCHEZ-SALGADO *et al.*, 2007; COOK e KNOX, 1975).

A presença de polissacarídeos também é comum neste gênero, entre eles foram isolados a D-galactose, o ácido D-galacturônico e a L-rhamnose em *C. religiosum*, os ácidos urônicos (ácido glucurônico e ácido galacturônico) e açúcares neutros (arabinose, rhamnose e galactose) em *C. gossipium*. Também em *C. gossipium* foram encontrados, β -D-galactopyranose, α -D-glucose, β -D-glucose, mannose e fructose (OJHA *et al.*, 2008; JANAKI e SASHIDHAR, 1998; VINOD *et al.*, 2009 DIALLO, B. E VANHAELEN).

Em *C. tintorium*, Nergard *et al.* (2005) isolaram 59.3% dos polissacarídeos altamente complexos, arabinogalactanas pécticas tipo II. Estes autores isolaram ainda, polifenóis (compostos galotânicos e ácidos ferúlicos), Diallo, Vanhaelen-Fastrb e Vanhaelen (1991) isolaram da fração volátil, a partir do extrato de éter de petróleo desta espécie, oito compostos cetônicos de cadeias longas e cinco triacilbenzenos. Desta espécie foram isolados ainda, sete carotenóides (DIALLO E VANHAELEN, 2001)

Almeida *et al.* (2005) caracterizaram os seguintes constituintes no óleo essencial obtido da raiz da *C.vitifolium*: β -caryophyllene, β -bisabolene, γ -muurolene, α -humulene, 1-hydroxy-3-hexadecanone e β -pinene. Por meio de análises fitoquímica de seus extratos isolaram os compostos excelsina, pinosinol, narigenina, ácido gálico e um triacilbenzeno, junto com β -sitosterol e estigmasterol e seus D-glucosídeos.

2.6.1.2. Características da espécie *Cochlospermum regium* (Martius & Schrank) Pilger

A espécie *Cochlospermum regium* (Mart. & Schrank) Pilger, sinonímia *Cochlospermum insigne* St. Hill (NUNES, 2000; RITTO e KATO, 1998) é de ocorrência comum no bioma Cerrado (cerrado *sensu stricto*, cerradão, campo limpo, campo sujo, campo cerrado, mata ciliar), Caatinga e Pantanal, das regiões Centro-Oeste e Nordeste do Brasil (CAMILO *et al.* 2007). Esta espécie por se desenvolver em todas as regiões de cerrado brasileiro pode ser encontrada com nomes populares diversos de acordo com a região, tais como: “algodãozinho-do-campo” em São Paulo, Mato Grosso e Goiás; algodão-cravo e algodão do mato em Pernambuco; algodoeiro-do-campo, butuá-de-corvo e pacotê no Ceará; e periquiteira-do-campo na Amazônia (PIO CORRÊA, 1975). Siqueira (1988) cita, ainda, os nomes algodão-bravo, periquiteira e butuá e Camilo (2008) faz referência a algodão-do-campo. No Tocantins, a espécie é também conhecida como algodãozinho-do-campo (UNITINS/MS/MMA – FMT-TO, 1998). Para Kirizawa (1981) os nomes periquiteira, butuá, butuá-de-corvo e pacotê comuns em regiões do norte e nordeste devem ser considerados com reserva uma vez que podem referir-se também a outras espécies.

O algodãozinho-do-campo (Fig. 5) é um arbusto de aproximadamente dois metros de altura, com raízes lenhosas, resistentes e bastante profundas (RITTO e KATO, 1998; CAMILO, 2008; KIRIZAWA, 1981). O caule é ferrugíneo e nodoso (RITTO e KATO, 1998). Suas folhas são verde-escuras, palmatífidas, com margem foliar variando de crenada a serrilhada, de consistência coriácea e superfície pubescente (KIRIZAWA, 1981). São alternas, longo-pecioladas, profundamente lobadas, com lobos agudos, em número de três a cinco. As

flores amarelas e pentâmeras medem cerca de seis centímetros de diâmetro e estão dispostas em panículas, contendo de cinco a dez flores. O cálice é castanho-avermelhado e irregular, apresentando duas sépalas exteriores de forma lanceolada e três interiores maiores e mais largas (KIRIZAWA, 1981; RITTO e KATO, 1998). As pétalas obovadas envolvem os estames distribuídos em cinco círculos concêntricos. Normalmente os botões florais ocorrem entre os meses de maio a julho, podendo, entretanto, aparecer fora deste período (KIRIZAWA, 1981). O gineceu é constituído por três carpelos de forma globosa (RITTO e KATO, 1998). A frutificação, germinação, desenvolvimento dos sistemas aéreo e subterrâneo ocorrem na época das chuvas. As sementes reniformes são envoltas por filamentos lanosos e compridos semelhantes aos do algodão. Os frutos formam cápsulas loculicidas com 3-5 valvas, inicialmente são verde-escuros, tornando-se acastanhadas quando as valvas se abrem para liberar as sementes. O sistema radicular é bem desenvolvido podendo atingir mais de 3 metros de comprimento, por vinte centímetros de diâmetro (KIRIZAWA, 1981).

As partes subterrâneas de *C. regium* são constituídas em sua maior parte por raiz, sendo as regiões, caulinar (hipocótilo) e do coleto, reduzidas. Num corte transversal da raiz observa-se uma casca de coloração vinhosa estreita e uma região cortical pouco desenvolvida, onde por meio de análise microscópica, pode se visualizar bolsas taníferas, representadas por grandes células cujo conteúdo reage com cloreto férrico, originando coloração escura ou quase negra. Drusas de oxalato de cálcio e grãos de amido de forma arredondada podem também ser observadas nesta região (RITTO e KATO, 1998).

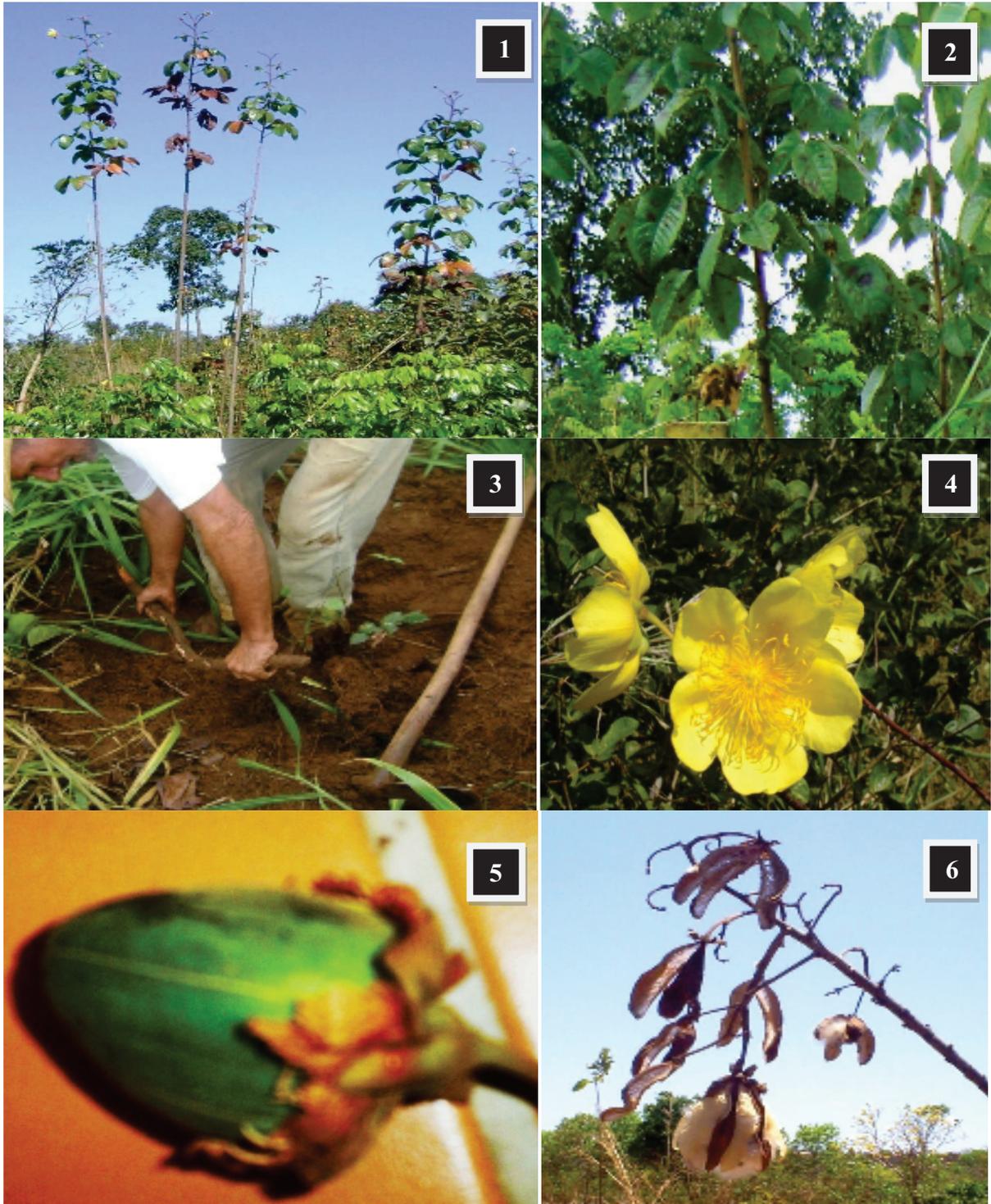


Fig. 5. *Cochlospermum regium*. 1. Arbustos com cerca de dois metros; 2. Detalhe das folhas trilobadas longo-pecioladas; 3. Detalhe da coleta a raiz: note-se a profundidade e o comprimento; 4. Flores amarelas, pentameras dispostas em panículas e com estames dispostos em círculos concêntricos; 5. Fruto ainda verde, com presença do cálice; 6. Frutos secos abertos para liberar a semente pilosa semelhante à do algodão.

2.6.2. Etnobotânica

Na medicina popular as raízes de *C. regium* são utilizadas na forma de fatias, lascas ou pó, no preparo de decoctos, infusos e garrafadas como agentes antiinflamatórios no caso de artrite reumatóide. O chá de suas raízes tem sido usado, ainda, no tratamento de inflamações intestinais, uterinas, ovarianas, prostáticas, afecções da pele, gastrites, úlceras e leucorréia. A planta tem sido descrita também como depurativa do sangue, para tratamento do colesterol e como laxativa (NUNES *et al.*, 2003; NUNES e CARVALHO, 2003; PIO CORRÊA, 1975; RITTO, 1996; CAMILO, 2008; LIMA *et al.* 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1996; ANDRADE, 2008). Siqueira (1988) adverte, entretanto, que a infusão da raiz é empregada como um perigoso purgativo, devendo-se tomar o cuidado de evitar doses excessivas no uso desta planta.

Estudos realizados por Nunes *et al.* (2003) na cidade de Campo Grande (MS) mostraram que o algodãozinho está entre as seis plantas mais indicadas por raizeiros. Enquanto Treverzol *et al.* (2006) estudando o mercado informal de plantas medicinais em feiras livres da cidade de Goiânia, constataram que muitas plantas eram adquiridas de extrativistas de outros estados, devido à dificuldade de encontrar a espécie em função do desmatamento provocado pela crescente urbanização e/ou pela destinação das áreas a cultivos agrícolas e pastagens.

Com relação a medicamentos formulados com produto extrativo de *C. regium*, a literatura apresenta o “Extrato Composto Magaraz” (*Cinchona calisaya*, *Costus spic*, *Cochlospermum insigne* e *Croton campestris*), fitoterápico produzido pelo Laboratório Magaraz - Araguari (MG), indicado para o tratamento de úlcera, gastrite, má digestão e infecção urinária. Este medicamento teve sua apreensão e recolhimento em todo o território nacional determinados pela ANVISA, através da Resolução nº 1.175 de 08 de julho de 2002, por falta comprovação de eficácia. Segundo este Órgão, as alegações terapêuticas do medicamento baseavam-se na propaganda que o laboratório fazia do produto (BRASIL, 2002).

2.6.3. Fitoquímica e Atividades Biológicas

Dentre os compostos caracterizados em *Cochlospermum regium* estão flavonóides, triterpenóides, taninos (RITTO, 1996; KIRIZAWA, 1981), saponinas, compostos fenólicos (RITTO, 1996), óleos essenciais, mucilagens e alguns açúcares como glicose,

frutose, rafinose e sacarose (KIRIZAWA, 1981). Considerando que droga é a matéria prima que sofreu alguma transformação para servir de base para medicamento (OLIVEIRA *et al.*, 1996), Ritto (1996) analisou a droga algodãozinho-do-campo e concluiu que esta possui como parte de seus constituintes químicos a 1-hidroxitetradecanona-3 e flavonóides. Lima *et al.* (1995) isolaram dos rizomas da espécie, o flavonóide dihidrokaempferol 3-O-glucopiranosídeo, com o qual foram feitos alguns testes biológicos. Assim, Castro (2000) avaliou e comprovou a atividade antinociceptiva desta fração, Castro *et al.* (1994) demonstraram sua atividade analgésica e anti-edematogênica, porém experimentos realizados por Oliveira *et al.* (1996), não detectaram para a referida fração, atividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, enquanto o extrato hexânico e a fração acetato de etila obtidos da parte subterrânea desta espécie mostraram atividade para ambas as bactérias e sua fração butanólica apresentou ação antibacteriana apenas para *E. coli*. Os referidos extrato e frações revelaram presença de taninos, o que pôde justificar a atividade antimicrobiana. O decocto preparado na concentração descrita pela medicina popular não demonstrou resultado efetivo.

Brum *et al.* (1997) analisando o óleo essencial de *C. regium*, identificaram por meio de CG/EM os seguintes compostos: β -selinene (34,1%), elemene (5,4%), trans-caryophyllene (5,4%), α -pinene (3,4%), α -humulene (2,8%), aromadendrene (2,1%), α -selinene (1,2%), δ -cadinene (0,8%) e outros compostos não identificados (45,4%). Testes biológicos realizados detectaram a atividade antibacteriana deste óleo essencial sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*.

A avaliação da atividade antiulcerogênica induzida por indometacina, do extrato alcoólico liofilizado de *C. regium*, apresentou resultados significativos inibindo a lesão gástrica provocada e apresentou moderada toxicidade por via intraperitoneal (i. p.) tendo sido, porém, considerado atóxico por via oral (RITTO *et al.* 1996).

Segundo esses autores, o extrato fluido desta espécie não demonstrou atividade analgésica e antiinflamatória, nos modelos testados, não reduziu, nas dosagens empregadas, o edema auricular induzido pelo óleo de cróton a 5%. Em contraposição, Santos Neto (2009) comprovou as atividades analgésica, antiinflamatória e antipirética, referenciadas pelo uso popular, através de experimentos realizados com o extrato hidroalcoólico bruto (EHA) da raiz de *Cochlospermum regium* em ratos utilizando os testes da formalina, edema de pata induzido por carragenina e febre induzida por lipopolissacarídeo (LPS).

Em estudo fitoquímico da casca do caule de *C. regium*, Leal (1998), por meio de fracionamentos cromatográficos isolou quatro substâncias do extrato benzênico [β -sitosterona, β -sitosterol, 3,5,4'-trihidroxi-7,3'-dimetoxiflavona (Rhamnazina) e o ácido gálico] e outras quatro do extrato etanólico, o p-hidroxicinamato de triacontanila, substância inédita na literatura, até então, a narigenina, o 7-O-glicosídeo da narigenina (Prunina) e o 4'-O-glicosídeo da narigenina), utilizando para as determinações estruturais métodos espectrométricos (UV, IV, RMN¹³C, RMN¹H e CG/EM). Estas substâncias foram submetidas a testes de atividade antimicrobiana não apresentando atividade significativa.

A atividade mutagênica e citotóxica do extrato aquoso liofilizado do rizoma de *C. regium* administrado via (i. p.) foi avaliada pelo teste micronúcleo em eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos, que avalia o poder mutagênico e citotóxico de substâncias *in vivo*. Os resultados permitiram concluir que o *C. regium* apresentou atividade mutagênica e citotóxica. A ação citotóxica foi verificada pelo decréscimo da relação eritrócitos policromáticos e normocromáticos (EPC/ENC) e a atividade mutagênica pelo aumento na frequência de micronucleados em eritrócitos policromáticos, em relação ao grupo controle (SANTOS, 2002; CASTRO *et al.*, 2004). Castro *et al.*, (2004) sugeriram que a atividade mutagênica desta planta poderia estar associada à ação dos seus constituintes químicos, tais como flavonóides, taninos, substâncias fenólicas e terpenóides. Estes resultados estão em consonância com os dados descritos por Toledo (1996), que também concluiu que o extrato hidroalcoólico apresentou moderada toxicidade aguda em camundongos quando administrado por via (i. p.). Este autor verificou, também, que o extrato apresentou baixa toxicidade para a administração oral e que foi bem tolerado por estes animais no teste da toxicidade subaguda. Pelo mesmo teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos, Santos (2002) avaliou, também, a atividade antimutagênica por via i. p., utilizando concomitantemente com o extrato da planta, as substâncias mutagênicas mitomicina C (MMC) e ciclofosfamida (CP). Os resultados mostraram que o extrato de *C. regium* não apresentou atividade antimutagênica nas condições experimentais realizadas. Utilizando a mesma metodologia descrita acima, Andrade *et al.* (2008) avaliaram a antimutagênicidade do extrato aquoso de *C. regium* e comprovaram os resultados obtidos pelos primeiros, ou seja, o extrato não exibiu efeito antimutagênico.

Com o objetivo de verificar a potencial atividade citotóxica do extrato aquoso de *C. regium* investigou-se, *in vitro*, o efeito deste extrato em células ovarianas de hamster chinês (CHO-K1). Para tanto, avaliou-se proliferação celular e apoptose. Os resultados da

investigação confirmaram a toxicidade do extrato de *C. regium* para células imortais, não tumorais CHO-K1, pela inibição da proliferação e indução da apoptose da célula. Considerando ser o extrato de *C. regium* uma mistura complexa de substâncias, torna-se difícil responsabilizar um componente em particular pela toxicidade observada. (CESCHINI e CAMPOS, 2006). Segundo Galati e O'Brien, (2004) a literatura tem reportado aos flavonóides, taninos e saponinas como portadores de efeitos antagônicos, agindo, em alguns casos, como moléculas tóxicas e, em outros, como protetoras.

Por outro lado, o extrato aquoso da raiz de *C. regium* em células germinativas de machos de *Drosophila melanogaster* Meigen, testado para a capacidade de induzir a perda do cromossomo X em anel, não apresentou efeito mutagênico nas concentrações testadas de 13, 19 e 25⁻¹ g/L (NUNES e CARVALHO, 2003). Da mesma forma, a atividade mutagênica do extrato liofilizado da raiz do algodãozinho-do-campo foi avaliada em cepas de *Salmonella typhimurium* pelo teste de Ames, que tem como princípio avaliar a mutagênese bacteriana pelo número de células revertentes para a prototrofia de histidina. Pelos resultados obtidos, pôde-se observar que não houve um aumento considerável no número de células revertentes, concluindo-se que o algodãozinho-do-campo não exibiu atividade mutagênica nas condições experimentais realizadas e que o tratamento simultâneo do extrato e agentes mutagênicos, causou uma diminuição significativa do número de revertentes, podendo-se concluir que o *C. regium*, provavelmente atuou como um desmutagênico (CARVALHO, 2002).

O potencial genotóxico da planta foi determinado por meio de dois testes com *Drosophila melanogaster*: o teste para células somáticas e o teste Ring-x-loss para células germinativas. Os resultados indicaram ausência de efeito genotóxico para células germinativas de *Drosophila melanogaster*, concentração de 0.025 g/mL, mas detectou que causa mutação e recombinações em células somáticas (NUNES, 2000).

Em relação aos estudos toxicológicos realizados, Sólón *et al.* (2009) recomendam que o uso popular de *C. regium* como droga medicinal, deve ser cauteloso até que se haja maiores subsídios científicos que garantam a sua segurança. Estes autores apontam, também, para a necessidade de estudos tecnológicos associados aos biológicos e químicos, com objetivo de se obter extratos secos com menor teor de substâncias indesejáveis e enriquecidos com substâncias ativas.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SOLVENTES

3.1.1 Para cromatografia:

- n-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, todos de pureza analítica (PA).

3.1.2 Para ressonância magnética nuclear:

- Foram usados como solventes, o clorofórmio e DMSO deuterados P.A. das marcas Merck® e Aldrich® e como padrão de referência foi usado trimetilsilano (TMS).

3.2 REVELADORES:

- Como reveladores não destrutivos foram usados radiação ultravioleta com comprimentos de onda 254 e 365 nm e como destrutivos utilizou-se solução de vanilina ácida.

3.3 MATERIAL CROMATOGRÁFICO

3.3.1 Cromatografia em coluna de vidro (CC)

- Para a separação dos compostos por cromatografia de adsorção foram usadas sílica gel 60 (60-200 Mesh e 70-230 Mesh), de procedência Merck® e sílica gel tipo “flash” (230-400mesh), Merck®.

3.3.2 Cromatografia em camada delgada analítica (CCD)

- Para a realização das análises em CCD foram usadas cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F254, Macherey-Nagel®.

3.4. MATERIAL VEGETAL

3.4.1. Seleção da Planta

A espécie *Cochlospermum regium* foi selecionada a partir de estudo descritivo retrospectivo, em que os dados foram coletados do Levantamento Etnobotânico e Etnofarmacológico do Projeto do Bosque da Biodiversidade da UNITINS / Ministério da Saúde (MS) / Ministério do Meio Ambiente (MMA) – convênio com a FMT (UNITINS/MS/MMA - FMT-TO, 1998). Foram aplicados os 7.028 questionários semi-estruturados à população de 10 cidades do estado do Tocantins, amostradas considerando as maiores, as menores e as de interesse histórico, utilizando amostragem por conglomerado bietápico.

A seleção da espécie para o estudo teve como critérios: ser nativa do Bioma Cerrado do estado do Tocantins; ter tido maior número de citações populares na pesquisa; e após revisão bibliográfica realizada nas bases de dados CAPES, LILACS, PubMed e MEDLINE, anais de congressos, jornadas e simpósios, artigos publicados em periódicos, dissertações e teses, ter-se verificado inexistência ou inconsistência de estudos publicados sobre a mesma ou sobre a parte desta a ser pesquisada.

3.4.2. Coleta e identificação

As raízes de *Cochlospermum regium* (Bixaceae) foram coletadas (Fig. 6) numa região de Cerrado no município de Araguaína, estado do Tocantins. A coleta realizada no período matutino do dia 16 fevereiro de 2009, foi georreferenciada por GPS (Global Position System) - sistema de navegação por satélite, (marca Garmin V, nº de série 73057299), apresentando a seguinte localização geográfica: latitude 07° 16' 12.5'sul e longitude oeste 048° 15' 42.4''.



Fig. 6. Coleta da raiz de *C.regium* feita por um mateiro

A espécie foi identificada como *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger, pela Prof^a. Dr^a. Mirley Luciene dos Santos, da Universidade Estadual de Goiás (UEG), tendo sido uma exsicata da mesma incorporada ao acervo do Herbário desta Instituição sob nº de registro 5.902.

3.5 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.5.1. Método de obtenção dos extratos brutos

As raízes de *C. regium*, após serem lavadas e moídas, foram submetidas à secagem em estufa com ar circulante, marca Hydrosan, modelo HY-4 BOSDA, à temperatura de 40°C por 72 horas e finalmente, trituradas em moinho de faca Tipo Willye TE – 650, Tecnal®. O material vegetal triturado foi, então, submetido a processos exaustivos de maceração, à temperatura ambiente, com os solventes orgânicos hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, nesta ordem crescente de polaridade. Na Fig. 7 se apresenta o fluxograma deste processo.

Após as extrações, as soluções extrativas foram filtradas e, na seqüência, os solventes foram removidos sob pressão reduzida, com auxílio de evaporador rotativo (Büchi®

R-205), com controlador de vácuo V-805, acoplado a banho-maria (Büchi® B-490) mantido a 40°C e recirculador refrigerado (banho ultratermostatizado modelo MA-184) marca Marcone®, programado para -2°C. Dessa forma, foram obtidos extratos de hexano (CrRH), de diclorometano (CrRD) de acetato de etila (CrRAc) e de metanol (CrRM).

Finalmente, após evaporação dos solventes, submeteram-se os extratos a congelamento, seguido de liofilização em liofilizador de bancada, Terroni®, modelo LS3000, para a retirada da água residual. Os extratos, assim como as frações obtidas a partir destes, foram armazenadas em ultra-freezer vertical -86°C, Indrel®, modelo IULT 335 Special.

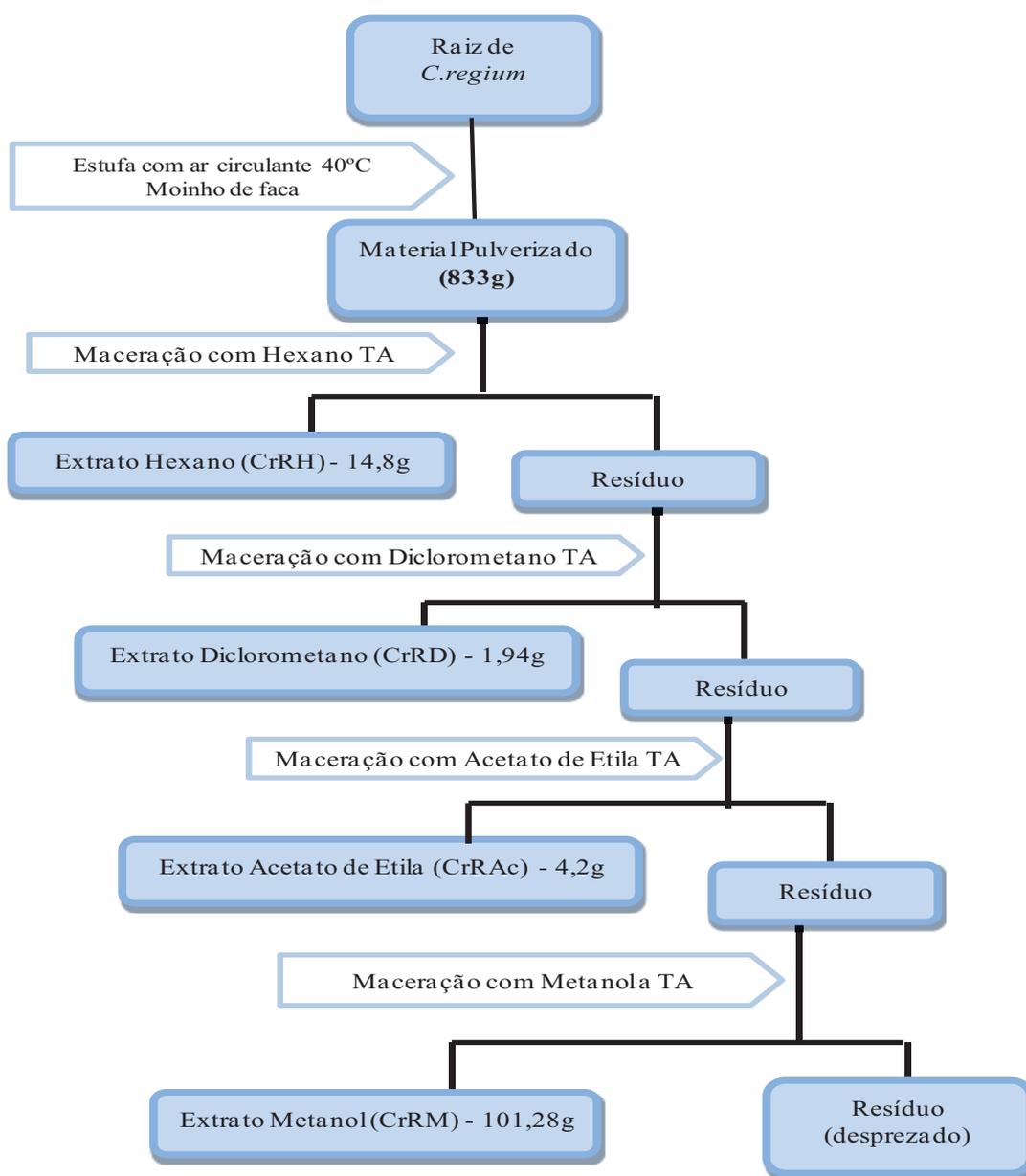


Fig. 7. Fluxograma geral de obtenção dos extratos da raiz de *C. regium*.

3.5.2. Isolamento e purificação dos constituintes químicos obtidos de raiz de *C. regium*

Os extratos hexânico, diclorometânico e de acetato de etila obtidos como apresentado anteriormente foram submetidos a fracionamento e purificação em cromatografia por adsorção usando coluna de vidro, empacotada com sílica-gel 60 (60-200 Mesh e 70-230 Mesh) e sílica gel flash (230-400 Mesh). As colunas de vidros utilizadas foram de diferentes diâmetros e alturas, sendo selecionadas de acordo com a quantidade do material a ser cromatografado e sua polaridade. Todas as frações em estágio de semi-purificação foram monitoradas por CCD e reveladas com luz UV e vanilina ácida, sendo as frações com Rfs semelhantes, reunidas. As amostras foram submetidas ao processo de eluição com sistemas binários de solventes de polaridades crescentes, sendo utilizados hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. A mistura de solventes e o gradiente inicial de eluição foram determinados em função do melhor Rf obtido em CCD, previamente executada.

Os fluxogramas dos procedimentos experimentais realizados para o isolamento e purificação dos constituintes químicos presentes na raiz de *C. regium* estão representados nos esquemas apresentados nas figuras a seguir.

3.5.2.1 Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico (CrRH) da raiz de *C. regium*

O extrato CrRH oriundo do processo de maceração exaustiva das raízes de *C. regium* em hexano foi submetido à cromatografia em coluna através de sílica gel 60 (70-230 Mesh), utilizando como eluentes a mistura binária Hex:AcOEt em gradiente de polaridade crescente. A referida coluna foi empacotada com hexano e iniciou-se o processo de eluição a 0,05% de AcOEt, terminando com 30% deste solvente. Foram coletadas 216 alíquotas, reunidas em 14 novas frações pela similaridade dos Rfs, de onde resultaram as sub-frações 151-157 e 211-213, que após passarem por um processo de lavagem com hexano e recristalização em MeOH, foram obtidas as substâncias A (SA) e B (SB), conforme representado no esquema da Fig. 8.

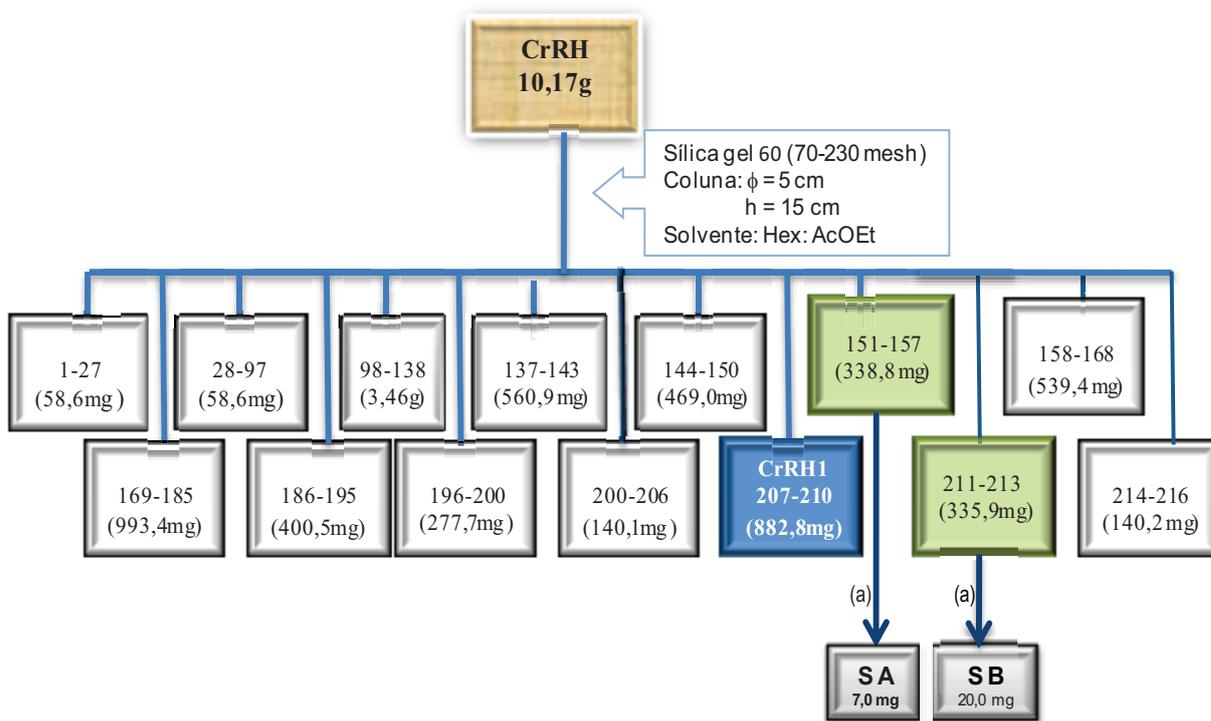


Fig. 8. Fluxograma do processo de fracionamento do extrato hexânico das raízes de *C. regium*. Nas frações identificadas com a cor verde houve cristalização dos compostos, que após passar por processo de purificação com MeOH (a), recristalizaram formando as substâncias A (SA) e B (SB). A fração identificada com a cor azul foi recromatografada.

3.5.2.1.1. Fracionamento, isolamento e purificação das substâncias presentes na fração CrRH1

A fração CrRH1 cromatográfico do extrato em hexano das raízes de *C. regium* foi submetida a um novo fracionamento em cromatografia por adsorção usando sílica gel 60 (70-230 Mesh). A coluna foi empacotada usando uma mistura de Hex:AcOEt a 10% de AcOEt. A eluição foi iniciada nesta concentração e a polaridade foi aumentada gradualmente até 100% de acetato de etila. Foram coletadas 244 frações, que foram reunidas de acordo com as semelhanças de Rf. Na sub-fração 59-88 houve cristalização de compostos sendo, então, submetida a processo de lavagem com metanol para purificação. Em seguida, a substância recristalizou e recebeu a denominação de substância C (SC). O esquema apresentado na Fig. 9 ilustra este processo.

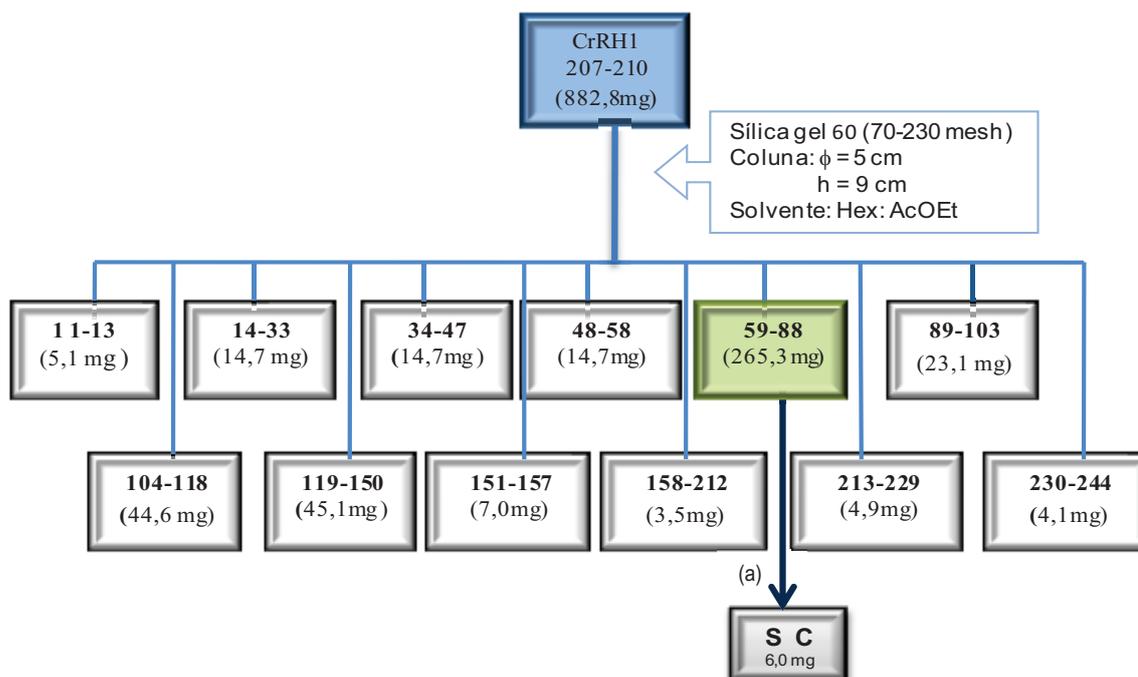


Fig. 9. Fluxograma do processo de purificação da fração hexânica CrRH1 da raiz de *C. regium*. A cor verde identifica as frações onde houve cristalização de compostos. (a) procedimento de purificação, com posterior recristalização resultando na formação da substância C (SC). A cor azul identifica a fração que foi recromatografada.

3.5.2.2. Fracionamento cromatográfico extrato DCM (CrRD) das raízes de *C. regium*

O extrato CrRD originado do processo de maceração exaustiva das raízes de *C. regium* em diclorometano, foi submetido à cromatografia de adsorção em sílica gel 60 (70-230 Mesh). A fase móvel inicial usada na eluição consistiu em uma mistura de diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) (95:0,5), durante o processo cromatográfico a polaridade aumentou até 100% de metanol. Foram coletadas 155 frações, reunidas em 12 novas frações conforme perfil cromatográfico dos Rf observados nas placas de CCD, reveladas em UV (254 e 366nm) e vanilina ácida. A partir da fração 16-28, foi isolada a substância SD (9,0 mg), que foi purificada com hexano e recristalizada com metanol, conforme representado no esquema da Fig. 10.

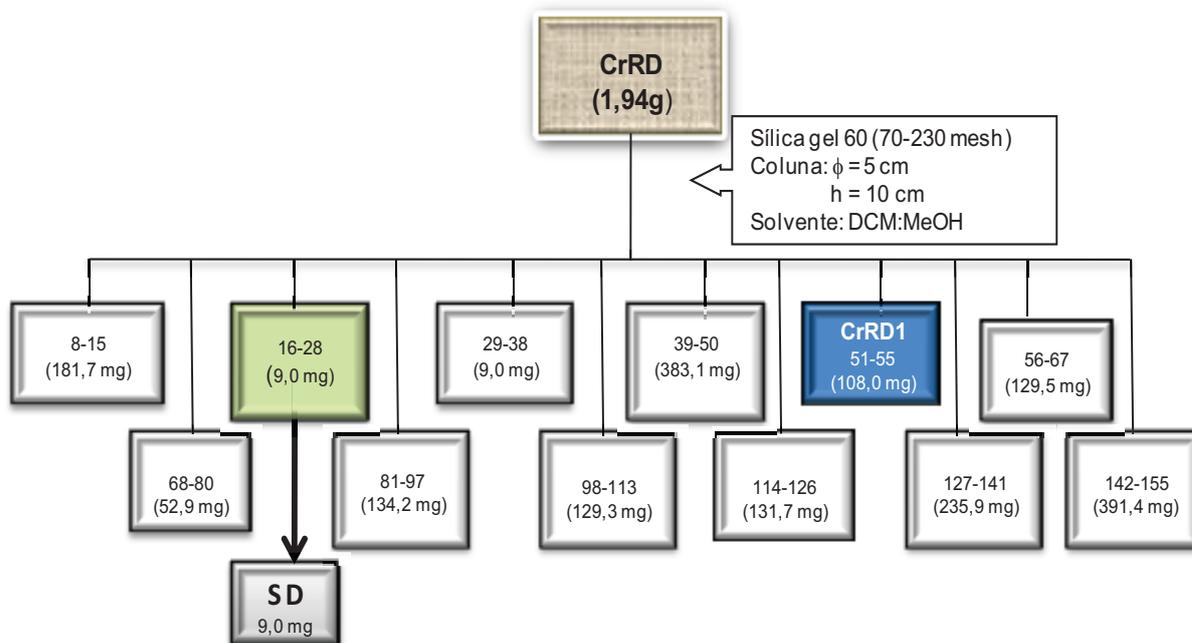


Fig. 10. Fluxograma do processo de fracionamento do extrato diclorometânico das raízes de *C. regium*. Nas frações representadas em verde, compostos foram cristalizados. Estes foram purificados e recrystalizados (a) formando a substância D (SD). A fração identificada com a cor azul foi submetida à nova cromatografia.

3.5.2.3 Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt (CrRAc) da raiz de *C. regium*

O extrato CrRD obtido no processo de maceração exaustiva das raízes de *C. regium* com acetato de etila foi submetido a um processo de purificação usando cromatografia por adsorção em sílica gel 60 (70-230 Mesh). A coluna foi empacotada com o auxílio da mistura de DCM e MeOH (95:0,5). A eluição das substâncias presentes no extrato iniciou-se com esta mistura de solventes e a polaridade foi aumentada de forma crescente até 100% de metanol. Deste processo cromatográfico, tendo por base o resultado os perfis em CCD, foram selecionados as frações CrRAc1 e CrRAc2, para novo fracionamento em CC. O fluxograma deste procedimento está apresentado na Fig. 11.

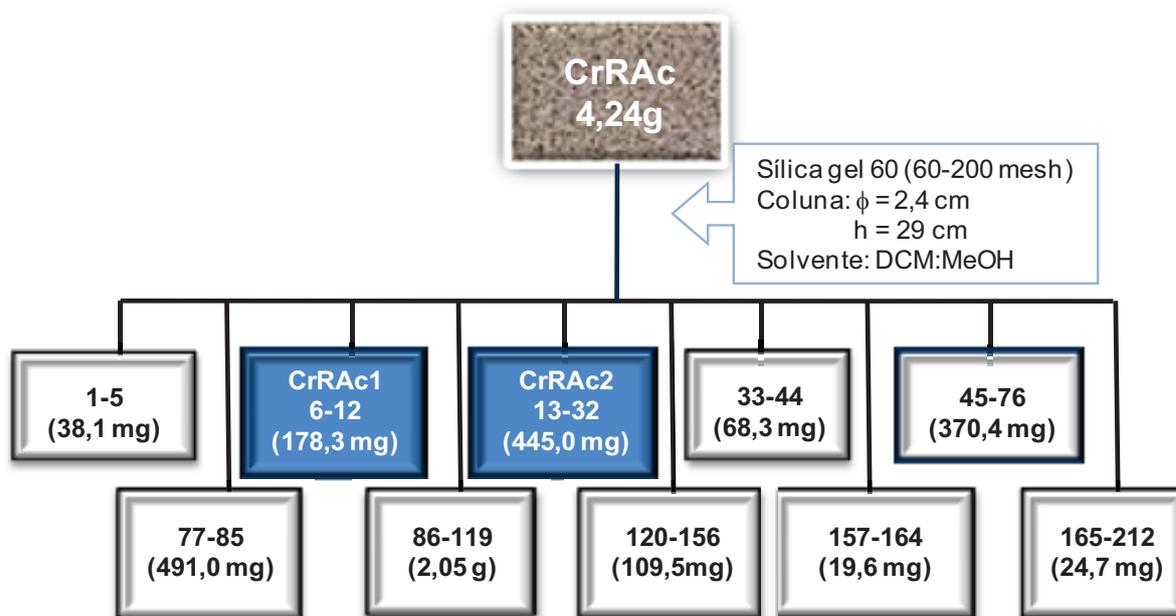


Fig. 11. Fluxograma do processo de fracionamento do extrato acetato de etila CrRac da raiz de *C. regium*. As frações representadas em azul foram recromatografadas.

3.5.2.3.2. Fracionamento cromatográfico fração CrRac1 do extrato AcOEt

A fração CrRac1 originada no processo de fracionamento apresentado anteriormente na Figura 11 foi fracionada submetida a novo fracionamento em CC usando sílica gel tipo “flash” (230-400 Mesh). A coluna foi empacotada com o auxílio da mistura de solventes DCM:MeOH a 2% de metanol. A eluição começou usando esta mistura e a polaridade da fase móvel foi aumentada de forma gradativa até 100% de metanol puro. Dessa forma foram coletadas 212 frações e reunidas em 10 frações. Na fração 37-42 houve cristalização de compostos que foram purificados com hexano e em seguida, esta substância foi recristalizada com metanol formando a substância identificada como E (SE – 23,0 mg), procedimento mostrado no fluxograma da Fig. 12.

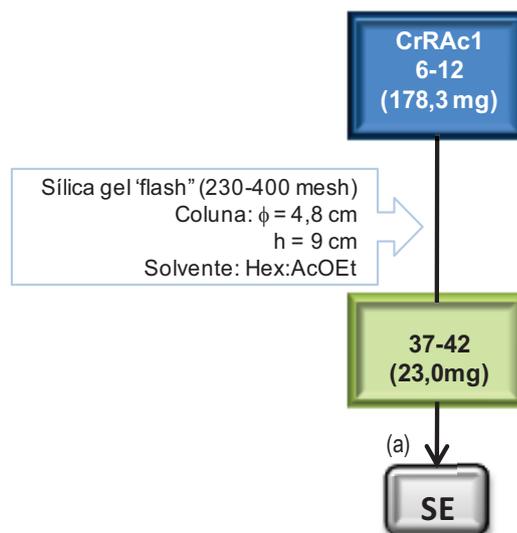


Fig. 12. Fluxograma do processo de re-fracionamento e purificação da fração acetato de etila CrRac1 de *C. regium*. A cor verde identifica a fração em que houve substância cristalizada, que passou pelos processos de purificação e recristalização (a), formando a substância E (SE). A cor azul identifica a fração que foi recromatografada.

3.5.2.3.2. Fracionamento cromatográfico das frações CrRac2 e CrRac2-1 do extrato AcOEt da raiz de *C. regium*

A fração CrRac2 obtida no processo de fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila das raízes de *C. regium* (CrRac) foi fracionada novamente usando cromatografia em coluna com sílica gel 60 (70-230 Mesh) como fase estacionária e o empacotamento da mesma foi realizado com a ajuda da solução da fase móvel inicial DCM:MeOH a 1% de metanol. Na eluição a polaridade aumentou até 100% de metanol. Neste processo de separação foram coletadas 212 frações e reunidas em 10 frações. A fração CrRac2-1 foi novamente fracionada em cromatografia por adsorção usando sílica gel tipo “flash”. O empacotamento da coluna foi realizado com uma mistura de hexano:acetato de etila (70:30) e a eluição das substâncias presentes nesta fração foi iniciada com esta mistura de solventes que durante o processo de separação sofreu um aumento gradativo de polaridade até atingir 100% de metanol. Da fração 18-35 isolou-se a substância F (SF), após ter sido purificada com hexano e recristalizada com metanol, conforme representado no esquema da Fig. 13.

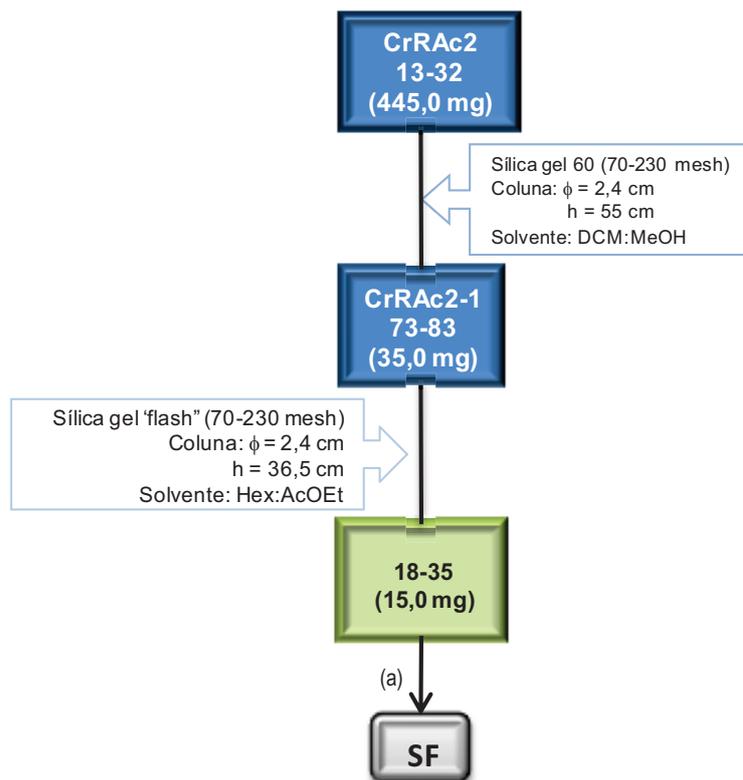


Fig. 13. Fluxograma do processo de re-fractionamento e purificação da fração acetato de etila CrRac2 e CrRac2-1 de *C. regium*. A cor verde identifica a fração em que houve substância cristalizada, a qual foi purificada e em seguida, recrystalizada (a), formando a substância identificada como F (SF). A cor azul identifica as frações que foram recromatografadas.

3.6. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS

A elucidação estrutural dos compostos isolados foi realizada por ^1H e ^{13}C RMN no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, usando um espectrômetro da marca Bruker modelo Advanced 3 de 500 MHz. Os compostos foram dissolvidos em CDCl_3 e foi usado TMS como padrão de referência.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Resultados do Levantamento Etnobotânico e Etnofarmacológico

O Levantamento Etnobotânico e Etnofarmacológico do Projeto Bosque da Biodiversidade da UNITINS/MS/MMA – FMT-TO, 1998 entrevistou 7.028 habitantes de 10 cidades do estado do Tocantins, sendo 5.799 do sexo feminino e 1.229 do sexo masculino (tabela 1), correspondendo a 82,5 e 17,5%, respectivamente. A faixa etária amostrada (tabela 2) foi de 6 a 98 anos, havendo predominância dos intervalos de 15 I– 25, 25 I– 35 e 35 I– 45 anos, na proporção de 22,5%, 24,0% e 17,3%, respectivamente. Foram levantadas 381 plantas medicinais.

TABELA 1. Distribuição da população pesquisada no Levantamento Etnobotânico e Etnofarmacológico do Projeto Bosque da Biodiversidade por Sexo

CIDADE	SEXO		Total Global
	Feminino	Masculino	
Araguaína	914	85	999
Araguatins	707	271	978
Colinas	788	144	932
Gurupi	787	185	972
Ipueiras	98	23	121
Lavandeira	126	94	220
Oliveira de Fátima	91	13	104
Palmas	687	126	813
Paraíso	753	175	928
Porto Nacional	848	113	961
Total Global	5799	1229	7028

TABELA 2. Distribuição da população pesquisada no Levantamento Etnobotânico e Etnofarmacológico do Projeto Bosque da Biodiversidade por faixa etária

FAIXA ETÁRIA	FEMININO	MASCULINO	TOTAL
5 I– 15	148	17	165
15 I– 25	1392	187	1579
25 I– 35	1462	227	1689
35 I– 45	1020	198	1218
45 I– 55	678	158	836
55 I– 65	497	164	661
65 I– 75	246	127	373
75 I– 85	96	28	124
85 I– 95	14	1	15
95 I– 105	1	1	2
Em branco	114	25	139
Nulas*	131	95	226
Total Global	5799	1229	7028

* Foram inclusas neste item as respostas não decifradas (rasuradas, ilegíveis e outros).

4.2. Resultado da seleção da espécie

Considerando os critérios estabelecidos para a seleção da espécie a ser estudada, conforme descrito na parte experimental, material vegetal, item 3.4.1 Seleção da planta (p. 59), foi selecionada a espécie algodãozinho-do-campo que obteve 304 citações, correspondendo a 4,33% do total de entrevistados. A grande maioria dos informantes relatou usar a casca da raiz ou do caule desta planta na forma de alcoolatura em (aguardente ou álcool), foi também citado seu uso na forma de chá (decoção) (tabela 3). Dentre as indicações terapêuticas mais frequentemente relatadas estão o tratamento de inflamações ginecológicas, renais, febre, leucorréia, afecções da pele, gastrites e dores internas, entre outras.

O levantamento do estado da arte sobre a espécie selecionada mostrou que os relatos científicos compilados sobre o *C. regium* indicaram haver estudos sobre a ação biológica, perfil químico e farmacognóstico da planta, entretanto, estes são ainda inconsistentes, necessitando uma maior contribuição científica nas áreas farmacológica, toxicológica e fitoquímica, esta, especialmente em relação à raiz, uma vez que o estudo fitoquímico da espécie (LEAL, 1988) foi realizado utilizando-se as casca do caule. Dessa forma, poder-se-ia fornecer subsídios que garantam o uso seguro dessas plantas pela população.

TABELA 3. Resultado da seleção da espécie a ser estudada a partir do Levantamento Etnobotânico e Etnofarmacológico do Projeto Bosque da Biodiversidade da UNITINS/MS/MMA – FMT-TO, 1998

DADOS PESQUISADOS	RESULTADOS
Nome popular	Algodãozinho-do-campo
Parte usada	Cascas da Raiz e do Caule
Modo de preparo	Alcoolatura (aguardente e álcool) e decocção
Número de citações	304
Percentual de citações	4,33%

4.3. Resultados da extração dos extratos brutos

Os resultados do rendimento mássico do processo de extração a partir da massa total de raízes de *C. regium* trituradas (833g) para a obtenção dos extratos hexânico, diclorometânico e acetato de etila, segundo a metodologia relatada na parte experimental e ilustrada no fluxograma apresentado na Fig. 7 (p.61) são apresentados na Tabela 2.

TABELA 4. Resultado do rendimento dos extratos brutos extraídos da raiz de *C. regium*.

<i>C. regium</i>	Solvente	Código	Massa do extrato (g)	Rendimento (%)
Raízes (833g)	Hexano	CrRH	14,84	1,78
	Diclorometano	CrRD	1,94	0,23
	Acetato de etila	CrRAc	4,24	0,51
	Metanol	CrRM	101,28	12,16
	Total	-	122,3	14,68

Apesar de ter apresentado maior rendimento mássico, o extrato metanólico não foi trabalhado, pois a extração exaustiva com o metanol despendeu um tempo muito longo, o que inviabilizou a execução dos procedimentos de fracionamento e purificação, que foram realizados na cidade de Anápolis e o prazo para defesa da dissertação estava expirando-se.

4.4. Resultados do fracionamento por cromatografia de adsorção dos extratos brutos

Os rendimentos mássicos das substâncias isoladas a partir dos extratos hexânico, diclorometânico e de acetato de etila se apresentam na Tabela 5.

TABELA 5. Rendimento das substâncias isoladas a partir dos extratos e do material vegetal de partida

Substância	Massa obtida (mg)	Rendimento em relação ao extrato (%)	Rendimento em relação ao material vegetal (%)
SA	7,0	0,07	0,0008
SB	20,0	0,20	0,0024
SC	6,0	0,06	0,0007
SD	9,0	0,46	0,0011
SE	23,0	0,54	0,0028
SF	15,0	0,35	0,0018

Como se observa nesta tabela as substâncias SB e SE foram obtidas em quantidades relativamente altas quando comparadas às demais. As substâncias SD e SE apresentaram os melhores rendimentos em relação aos extratos e as substâncias SE e SF em relação ao material vegetal.

4.5. Identificação das substâncias isoladas

Dentre as substâncias isoladas foram identificadas usando a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C as seguintes substâncias:

Substância A:

Isolada a partir do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico (CrRH), conforme metodologia anteriormente descrita na parte experimental (p. 62) e representada no esquema apresentado na Fig. 8. (p. 63) O metabólito isolado denominado primariamente de substância A - SA (7,0 mg), encontra-se em processo de identificação, parecendo, até o momento, ser uma substância inédita na literatura.

Substâncias B e F: Excelsina

A substância identificada inicialmente como SB (20,0 mg), originada do fracionamento cromatográfico de CrRH, descrito na metodologia apresentada anteriormente (p. 62) e representada esquematicamente na Fig. 8 (p. 63), bem como, a substância denominada inicialmente de SF (15,0 mg), proveniente da fração CrRAc2-1, conforme descrito anteriormente (p. 67) e esquematizado na Fig. 13 (p. 68), foram caracterizadas como excelsina Fig. 14 (p. 74). Este metabólito caracterizado como lignana, até o momento, somente foi isolado em uma espécie do gênero *Cochlospermum*, a *C. vitifolium* (ALMEIDA, 2005), sendo, portanto, a presença desta substância nos extratos de hexano e acetato de etila da raiz do *C. regium* inédita na espécie. Para os referidos autores, o isolamento de lignóides, é de relevante importância, em virtude das muitas atividades que lhes são atribuídas.

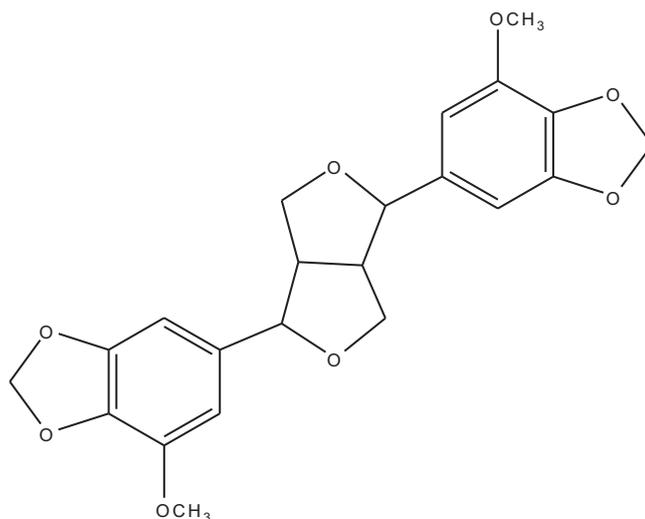


Fig. 14. Estrutura química da excelsina.

Substância C: Esteróide, ainda em processo de elucidação estrutural.

A substância inicialmente denominada SC foi isolada a partir do fracionamento cromatográfico da fração CrRH1, conforme metodologia descrita na p. 63 e apresentado no fluxograma mostrado na Fig. 9 (p. 64). Há, na literatura, registros da presença de esteróides no gênero *Cochlospermum*. Almeida *et al.* (2005) isolaram uma mistura binária dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol e outra mistura constituída de 3-O- β -glicopiranosil- β -sitosterol e 3-O- β -glicopiranosil-estigmasterol. Em *C. regium* foram isolados a β -sitosterona e o β -sitosterol na casca do caule (LEAL, 1988).

Substância D: Ácido p-hidroxicinâmico esterificado

Isolada a partir do fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico (CrRD), de acordo com metodologia relatada na p. 64 e apresentada esquematicamente na Fig. 10 (p. 65) a substância denominada de SD (9,0 mg), foi identificada como ácido p-hidroxicinâmico esterificado Fig. 15. Esta estrutura ainda não está totalmente definida, dados obtidos até o momento apontam a existência uma mistura de ácidos p-hidroxicinâmico, provavelmente variando o tamanho da cadeia lateral do éster.

Leal (1988) isolou o p-hidroxicinamato de triacontanila, (com 28 carbonos) na casca do caule desta espécie, inferindo tratar-se de substância inédita na literatura. A presença desta substância ainda não foi relatada na raiz desta planta.

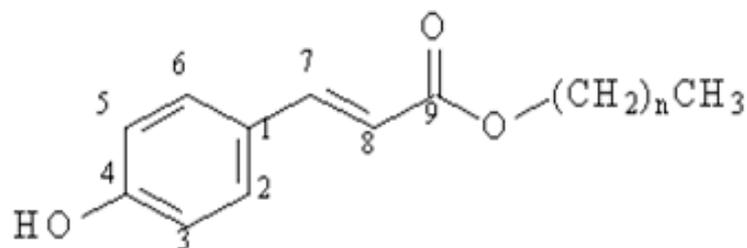


Fig. 15. Estrutura química do ácido p-hidroxicinâmico esterificado

Substância E: Naringenina

Inicialmente denominada substância SE (23mg), este constituinte originado do fracionamento cromatográfico da fração CrRac1, proveniente do extrato acetato de etila (CrRac), conforme descrito anteriormente na parte experimental (p. 66) e representado no esquema mostrado na Fig. 12 (p. 67), foi identificado como naringenina Fig.16. Este flavonóide (uma flavanona) está amplamente distribuído em citrinos (CARVALHO e GUIDO, 2008) e tem sido relatado para outras espécies do táxon *Cochlospermum* (SÁNCHEZ-SALGADO *et al.*, 2007; COOK e KNOX, 1975; ALMEIDA *et al.*, 2005). Em *C. regium*, Leal (1998) isolou esta substância na casca do caule. A presença de naringenina na raiz desta espécie, ainda não havia sido reportada na literatura.

Esta flavanona apresenta uma enorme variedade de atividades farmacológicas, como o efeito antioxidante, diminuição dos níveis de colesterol e lipídios no sangue, efeito antiinflamatório e anticarcinogênico (CARVALHO e GUIDO, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2007).

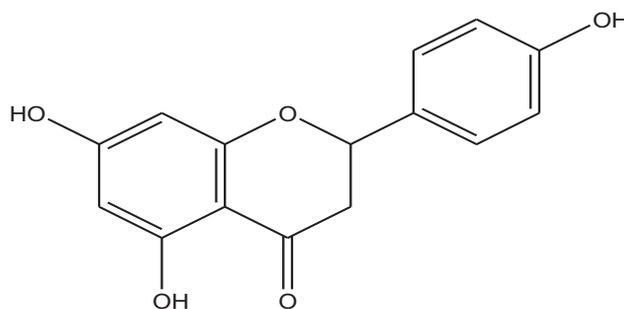


Fig. 16. Estrutura química da naringenina.

CONCLUSÕES

Do perfil fitoquímico de *C. regium* baseado no fracionamento, isolamento e identificação dos constituintes químicos dos extratos hexânico, diclorometânico e acetato de etila chegou-se aos seguintes resultados:

As substâncias identificadas como SA, SB e SC, foram isoladas do extrato hexânico. A substância SA encontra-se em processo de identificação, parecendo, até o momento, tratar-se de uma substância inédita na literatura. A substância SB foi identificada como excelsina. A substância SC foi caracterizada como esteróide e ainda se encontra em processo de elucidação estrutural.

A substância SD foi obtida a partir do extrato diclorometânico, tendo sido identificada como ácido p-hidroxicinâmico esterificado, que pela análise de RMN puderam-se observar misturas de ésteres na cadeia esterificada.

As substâncias SE e SF foram isoladas do extrato de acetato de etila. Tendo sido a substância SE identificada como naringenina e a substância SF como excelsina.

PERSPECTIVAS e RESULTADOS ESPERADOS

O somatório dos resultados obtidos neste estudo abre espaço para:

- A continuação deste trabalho visando à elucidação estrutural das substâncias não identificadas, bem como, a busca de atividades biológicas das substâncias identificadas e suas aplicações, tendo em vista o seu uso popular e o fato de ser uma espécie medicinal pouco estudada.
- Que os novos conhecimentos gerados sobre *C. regium*, planta medicinal de largo uso popular, possa servir de subsídios para elaboração de monografia da espécie.
- A identificação de novos produtos naturais, que possam ser utilizados no mercado farmacêutico e contribuir para a produção de novos fármacos ou para a cadeia produtiva do fitoterápico, representando alternativas de tratamento, especialmente, para o Sistema Único de Saúde (SUS).
- Que o conhecimento das propriedades benéficas da planta estudada, leve à conscientização da importância da preservação ambiental das plantas do Cerrado.
- Que as informações compiladas neste estudo possam facilitar e direcionar futuras pesquisas sobre a espécie e o gênero, além de subsidiar o emprego racional de *C. regium* na fitoterapia brasileira, abrindo um universo de possibilidades na prática terapêutica atual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRA M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FRANÇA P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol.18 .nº 3. P. 472-508. 2008.
2. ALBUQUERQUE, U. P. e HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 16 (Supl.). p. 678-689, 2006.
3. ALIYU, R.; OKOYE, Z. S. C. e SHIER, W. T. The hepatoprotective cytochrome P-450 enzyme inhibitor isolated from the Nigerian medicinal plant *Cochlospermum planchonii* is a zinc salt. **Journal of Ethnopharmacology**. vol.48, n. 2, p. 89-97. 1995.
4. ALMEIDA, S. C. X.; LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Constituintes químicos voláteis e não-voláteis de *Cochlospermum vitifolium* (Willdenow) Sprengel. **Química Nova**. v.28, nº 1, p. 57-60, São Paulo. 2005.
5. AMOROZO, M. C. de M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Brasília, v.16, n.2, p.189-203, abr. 2002.
6. ANDRADE, L. S.; SANTOS, D. B.; CASTRO, D. B.; GUILLO, L. A.; CHEN-CHEN, L. Absence of antimutagenicity of *Cochlospermum regium* (Mart. and Schr.) Pilger 1924 by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**. vl.68, n.1. São Carlos. 2008.
7. ANTHONY, J. P.; FYFE, L. E SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**. v. 21, n.10, p. 462-468. 2005.
8. ASSAD, M. L. L. Cerrado Brasileiro: Sabendo Utilizar Não Vai Acabar - diversidade de recursos e de possibilidades de uso In: CEBRAC. **Oportunidades de Geração de Renda no Cerrado: texto para discussão**. Fundação Centro Brasileiro de Referência e Apoio Cultural (CEBRAC). Brasília, 1999.
9. ATAS, L. Atenção à pobreza. **Revista Pesquisa FAPESP**. 91 ed. 2003. Disponível em: <http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=2260&bd=1&pg=1&lg>. Acesso em: setembro/2009.
10. BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; COSTA, C. G. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. 2. Ed., p. 218-219. v.1. Ed. Viçosa. 2002. 309 p.
11. BARREIRO, J. E. e BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, Vol. 32, nº 3, p.679-688, 2009.
12. BENOIT, F.; VALENTIN, A.; PELISSIER, Y; MARION, C.; DAKUIO, Z.; MALLIE, M.; BASTIDE, J.M.; Antimalarial activity in vitro of *Cochlospermum tinctorium* tubercle extracts. **Transactinos of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene**. 89:217-218. 1995.

13. BENOIT-VICAL, F.; VALENTIN, A.; MALLIE, M.; BASTIDE, J.M.; BESSIERE, J.M. *In vitro* antimalarial activity and cytotoxicity of *Cochlospermum tinctorium* and *Cochlospermum planchonii* leaf extract and essential oils. **Planta Medica**. 65:378-381. 1999.
14. BENOIT-VICAL, F.; VALENTIN, A.; DAB, B.; DAKUYOC, Z.; DESCAMPS, L. e MALLIÉ, M. N'Dribala (*Cochlospermum planchonii*) versus chloroquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Journal of Ethnopharmacology**, 89: 111–114. 2003.
15. BORGES, E. M. **Estudo fitoquímico de *Trichogonia menthaefolia* Gardner (Asteraceae-Eupatorieae)**. 2006. 98p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. 2006
16. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 60 p.
17. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº90, de 16 de março. **Guia para a realização de estudos de toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos**. 2004a.
18. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 1.175 de 08 de julho de 2002. Determina como medida de interesse sanitário, a apreensão, em todo território nacional, dos medicamentos Extrato Composto Magaraz, Diabesan Magaraz, Xarope Magaraz e Elixir Sena Magaraz, da empresa Indústria e Comércio de Produtos Naturais Magaras Ltda – Me. **Diário Oficial da União**. Brasília, 08 jul., 2002.
19. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº48, de 16 de março. **Dispõe sobre o Registro de medicamentos fitoterápicos**. 2004b.
20. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Ações Prioritárias para a conservação da biodiversidade do Cerrado e Pantanal**. Brasília: 1999. 26p.
21. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17, de 24 de fevereiro. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. 2000.
22. BRAZ FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. **Química Nova**, n.17, p. 405-45, 1994.
23. BRITO, A. R. M. S. Toxicologia Pré-Clínica de Plantas Mediciniais. In: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: ed. Unesp. 1996.
24. BRUM, R. L.; HONDA, N. K.; HESS, S. C.; CRUZ, A. B. e MORETTO, E. Antibacterial activity of *Cochlospermum regium* essential oil. **Fitoterapia**, vol. 68, no. 1, p. 79. 1997.
25. CAMILO, J. **Germinação e conservação de germoplasma de algodão-do-campo [*Cochlospermum regium* (Mart. Ex Schrank) Pilger] – Cochlospermaceae**. 2008. 95p.

Brasília. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, 2008.

26. CAMILLO, J.; VIEIRA, R. F.; SALOMÃO, A. N.; MUNDIM, R. C. Conservação a longo prazo de sementes de algodão-do-campo (*Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger. **XII Talento Estudantil. Resumo dos Trabalhos. Anais 2007**. EMBRAPA. Brasília. 2007.
27. CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**.33, p. 179-189, 2000.
28. CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, M. Phytotherapy and quality of herbal Medicines. **Fitoterapia**. 71, suplemento 1. p. S58-S65. 2000.
29. CARVALHO, D. e GUIDO, L. Desenvolvimento de uma metodologia para determinação de naringenina em frutos e seus derivados. 5^a Jornada Bebidas e Saúde. UNICER – Bebidas de Portugal, Leça do Balio. 2008. Disponível em: [http://www.ibesa.pt/gd/\\$documentos/5jornadabebidasesaude_14fev2008_id334.pdf](http://www.ibesa.pt/gd/$documentos/5jornadabebidasesaude_14fev2008_id334.pdf) . Acesso em outubro de 2009.
30. CARVALHO, L. L. L. S. **Deteção da atividade mutagênica e anti-mutagênica do *Cochlospermum regium* (algodãozinho do campo) pelo teste Ames**. 2002. 79p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2002.
31. CASTRO, D. B.; SANTOS, D. B.; FERREIRA, H. D.; SANTOS, S. C.; CHEN-CHEN, L. Atividades mutagênica e citotóxica do extrato de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (algodãozinho-do-campo) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 3, p. 15-19, 2004.
32. CASTRO, M. S. A. **Mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do 3-O-glicosildihidrocanferol, flavonóide extraído dos rizomas de *Cochlospermum regium* (algodãozinho)**. 2000.155p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2000.
33. CASTRO, M. S. A., DE SIQUEIRA, J. M., PAZ-VIEIRA, I. C., KASSAB, N. M. Estudos sobre o efeito analgésico e anti-edematogênico de uma flavanona isolada de *Cochlospermum regium*, “algodãozinho”. In: **XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**. Resumos. Fortaleza: UFC. 1994. 162 p.
34. CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**. vol.23, n.5. p.680-685 São Paulo, 2000.
35. CESCHINI, L. e CAMPOS, E.G. Cytotoxic effects of *Cochlospermum regium* (Mart. and Schrank) Pilger aqueous root extract on mammalian cells. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 103, no. 2, p. 302-305. 2006.
36. CECHINEL FILHO, V. e YUNES, R. A. E. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação

- estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**. vol.21, nº.1 São Paulo. p.99-105. 1998
37. CECHINEL FILHO, V. e YUNES, R. A. Estudo Químico de Plantas Medicinais Orientado para a Análise Biológica. Obtenção e Modificação Estrutural de Compostos Bioativos. In: YUNES, R. A e CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos. 2001. 523p.
38. COOK, I. F. e KNOX, J. R. Flavonoids from *Cochlospermum gillivrae*. **Phytochemistry**. Vol. 14, p. 2511-2512. 1975.
39. CORRÊA, P. G.; PIMENTEL, R. M. M.; CORTEZ, J. S. A.; XAVIER, H. S. Herbivoria e Anatomia Foliar em Plantas Tropicais Brasileiras. **Ciência e Cultura**. vol. 60 no.3. São Paulo. 2008.
40. DAVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fármacos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.6, n3, p.11-14. 2004.
41. DIALLO, B.; VANHAELEN-FASTRE, R.; KONOSHIMA, T.; KOZUCA, M.; TOKUDA, H. Studies on inhibitors of skin tumor primotion inhibitory effects of triterpenes from *Cochlospermum tinctorium* on Epstein-Barr virus activation. **Journal of Natural Product**, 52:879-881. 1989.
42. DIALLO, B.; VANHAELEN, M.; HIKINO, H. Antihepatotoxic actions of *Cochlospermum tinctorium* rizomes. **Journal of Ethnopharmacology**, 20:239-243. 1987.
43. DIALLO, B.; VANHAELEN-FASTRE, R.; VANHAELEN, M.; FIEGEL, C.; JOYEUX, M.; ROLAND, A.; FLEURENTIN, J. Further studies on the hepatoprotective effects of *Cochlospermum tinctorium* rizomes. **Journal of Ethnopharmacology**, 36:137-142. 1992.
44. DIALLO, B.; VANHAELEN-FASTRB, R. e VANHAELEN, M. Triacylbenzenes and long-chain volatile ketones from *Cochlospermum tinctorium* rhizome. **Phytochemistry**, vol. 30, n. 12, p.4153-4156, 1. 991.
45. DIALLO, B. E VANHAELEN, M. Apocarotenoids from *Cochlospermum tinctorium*. **Phytochemistry**, vol. 26, n. 5, p. 1491-1492. 1987.
46. DI STASI, L. C. Malvales medicinais. In: DI STASI, L.C. e HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. ver. e ampl. São Paulo: Editora UNESP, 2002.
47. DI STASI, L. C. Química de Produtos Naturais: principais constituintes. In: DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciencia um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: 5 ed.Unesp. 1996.
48. DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: verdades e mentiras**. São Paulo: Ed.UNESP. 2007. 133p.
49. EITEN, G. Vegetação do Cerrado. cap. 1. pp. 9- 65. In: **Cerrado: caracterização ocupação e perspectivas**. (org.) M. N. Pinto. Brasília: Ed. Universidade de Brasília. 1990. 657 p.

50. ELISABETSKY, E. e SOUZA, G. C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. p. 108. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. 1112p.
51. EMBRAPA CERRADOS. **Embrapa Cerrados: conhecimento, tecnologia e compromisso ambiental**. Planaltina, 1999, 34p.
52. FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. p. 229. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. 1112p.
53. FERRI, P. H. Química de Produtos Naturais: métodos gerais. In: Di Stasi, L. C. (org.). **Plantas Mediciniais: arte e ciência um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora UNESP, 1996.
54. FIOCRUZ/CICT/SINITOX (Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Informação Científica e Tecnológica/Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas). **Medicamentos**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox/medicamentos.htm>. Acesso em: 24/set/ 2009.
55. FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Mediciniais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP**. 2006. Disponível em: http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm. Acesso em: agosto/2009.
56. FUNARI, C. S. e FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 15(2): 178-182, 2005.
57. GALATI, G., O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine** 37, 287–303. 2004.
58. GOTTLIEB, O. R. e BORIN, M. R. M. B. 1994. The diversity of plants. Where is it? Why is it there? What will it become? **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 66 (Supl. 1 – Parte I): 205-210.
59. GUARIM NETO, G. E MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**. vol. 17 no.4. São Paulo, 2003.
60. GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. p. 229. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. 1112p.
61. HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K.; Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**. vol.30, p.3864-3874. 1991.

62. HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**. 2.ed. London: Chapman and Hall, 1988.
63. HEEMANN, A. C. W. **Estudo Fitoquímico, Botânico e das propriedades antimicrobianas de *Pterocaulon interruptum* DC. (Asteraceae)**. 2002. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002.
64. HOUGHTON, P. J. e RAMAN, A. **Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts**. London: Chapman e Hall, p.49-86. 1998.
65. JANAKI, B. E SASHIDHAR, R. B. Physico-chemical analysis of gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): a potential food additive. **Food Chemistry**, Vol. 61, n. 1/2, p. 231-236, 1998.
66. JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13 ed. Companhia Editora Nacional. p 468. São Paulo. 2002. 808p.
67. KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R. e GOTTLIEB, O. R. Chemical diversity of plants from Brazilian Cerrados. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 66 (Supl. 1 – parte I): 50-55. 1994.
68. KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, vol. 1 p.147-155. 2005.
69. KIRIZAWA, M. **Contribuição ao conhecimento morfo-ecológico e do desenvolvimento anatômico dos órgãos vegetativos e de reprodução de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger – Cochlospermaceae**. 1981. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1981.
70. LAPA, A. J.; SOUCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais. In: SIMÕES. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. p. 247-262. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. 1112p.
71. LEAL, R. S. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste: *Plathymenia reticulata* Benth e *Cochlospermum regium* Mart**. 1988. 206p. Mestrado. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 1988.
72. LIMA D. P.; CASTRO, M. S. A.; MELLO, J. C. P.; SIQUEIRA, J. M.; KASSAB, N. M. A. flavanone glycoside from *Cochlospermum regium*. **Fitoterapia**. 66, p.545-546, 1995.
73. LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum. 2002.
74. MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, vol. 25, nº.3, 429-438, 2002.
75. MATOS, F. J. A.; **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Ed. da UFC, Fortaleza, Ceará. 1988.

76. MAURY, C. M. **Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Ministério do Meio Ambiente – MMA, Brasília. 2002. 404 p.
77. MENCONI, D. e ROCHA, L. Riqueza ameaçada. **Isto É**. 1773: 92-98. 2003.
78. MENDONÇA, R. C.; FELFINI, J. M.; WALTER, B. M. T. Flora vascular do cerrado. In: Sano, S. M.; Almeida, S. P. **Cerrado, ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa/CAPC, p. 289-556, 1998.
79. MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A. Análise da valoração dos impactos ambientais e da demanda de fitoterápicos oriundos do maracujá no Brasil. **Revista da FAE**. Curitiba, v.11, n.1, p.19-32, 2008.
80. MIGUEL, M. D. e MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. Ribeirão Preto: Tecmed. 2004.
81. MIGUEL, M. D. e MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. Robe editorial. p.18. São Paulo, 2000. 115p.
82. MIGUEL, O. G.; **Componentes químicos de *Sebastiania schottiana* Muell. Arg.: Hipóteses sobre a correlação entre estrutura a atividade farmacológica**. 1987. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 1987.
83. MONTANARI, C. A. e BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, vol. 24, No. 1, 105-111, 2001.
84. MORAIS, I. C.; SILVA, L. D. G.; FERREIRA, H. D.; PAULA, J. R.; TRESVENZOL, L. M. F. Levantamento sobre plantas medicinais comercializadas em Goiânia: abordagem popular (raizeiros) e abordagem científica (levantamento bibliográfico). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2. (supl.), p. 13-16, 2005.
85. MOREL, C. M. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, vol. 22 nº8, p.1522-1523, 2006.
86. NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, K.; MICHAELSEN, T. E.; MATSUMOTO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H. E PAULSEN, B. S. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: Anti-ulcer-, radical scavenging- and imunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 96, n.1-2, p. 255-269. 2005.
87. NIERO, R. 1993. **Isolamento e identificação de compostos de *Phyllanthus corcovadensis* com efeito analgésico. Correlação estrutura-atividade**. 1993. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 1993.
88. NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S.N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B. e CECHINEL FILHO, V. (org).

Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos 1 ed. Editora do Vale do Itajaí: UNIVALI. p.25-30. 2003.

89. NIWA, Y.; MIYACHI Y.; K. ISHIMOTO; KANO T. Why are natural plant medicinal products effective in some patients and not in others with same disease? **Planta Médica**, New York, v. 57, n. 4, p. 299–304, 1991.
90. NOGUEIRA, A. C.; KUNIYOSHI, Y. S.; HATSCHBACH, G.; LIMA, M. T. E. *Cochlospermum regium* (Mart. e Shcrank) Pilger – germinação e reintrodução no estado do Paraná. In: **XLIX Congresso Nacional de Botânica**. Anais. Salvador. 1998.
91. NUNES, W. B. e CARVALHO, S. Evaluation of the mutagenic potential of *Cochlospermum regium* in *Drosophila melanogaster* male germ cells. **Genetic and Molecular Biology**, vol. 26, no. 4, p. 545-549. 2003.
92. NUNES, W. B. **avaliação do potencial mutagênico e/ou recombinogênico do algodãozinho do campo em células somáticas e germinativas de *D. melanogaster***. 2000. 112p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2000.
93. NUNES, G. P.; SILVA, M. F.; RESENDE, U. M.; SIQUEIRA, J. M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2. 2003.
94. OJHA, A.K.; MAITI, D.; CHANDRA, K.; MONDAL, S.; ROY, D. D. S. K.; GHOSH, K. E ISLAM, S. S. Structural assignment of a heteropolysaccharide isolated from the gum of *Cochlospermum religiosum* (Katira gum). **Carbohydrate Research**, 343 p.1222–1231. 2008.
95. OLIVEIRA, C.C.; SIQUEIRA, J. M.; SOUZA, K. C. B. e RESENDE, U. M. Antibacterial activity of rhizomes from *Cochlospermum regium*: preliminary results. **Fitoterapia**, vol. 67, no. 2, p. 176-177. 1996.
96. OLIVEIRA, A.B e BRAGA, F. C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina científica**. v 1, p. 49-58, 2003.
97. PIO CORREA, M. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional (Ministério da Agricultura, Indústria e Comércio). v.1, 747p. 1975.
98. PINTO, A C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. **Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas**. **Química. Nova**, vol. 25, 45-61, 2002.
99. POPPENDIECK, H. H. Cochlospermaceae. 2003. In: KUBITZKI, KLAUS; BAYER and CLEMENS (Orgs.). **Flowering Plants. Dicotyledons: Capparales, Malvales and Non-betalain Caryophyllales**. Series: The Families and Genera of Vascular Plants. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=I8oMV1lsS6kC&pg=PP9&lpg=PP1#>. Acessado em: agosto de 2009.

100. PRESBER, W.; HEGENSCHIED, B.; FRIEDMANN-ALVERMANN, B.; DORGE, S.; VOIGT, G.; HILLER, K.; HILS, J. Antiviral activity of *Cochlospermum angolense*. **Pharmazie**, 42:707-708. 1987.
101. PRESBER, W.; HEGENSCHIED, B.; HERNANDEZ-ALVAREZ, H.; HERRMANN, D. e BRENDDEL, C. Inhibition of the growth of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* *in vitro* by an extract of *Cochlospermum angolense* (Welw.). **Acta Tropica**, vol. 50, n. 4, p. 331-338. 1992.
102. PROENÇA, C.; OLIVEIRA, R. S. e SILVA, A. P. **Flores e frutos do cerrado**. Ed. UnB, Brasília. 2000.
103. RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**.v.39, p 603-613. 2001.
104. RATTER, J.A., RIBEIRO, J. F., BRIDGEWATER, S. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Ann Bot.**, 80: 223-230, 1997.
105. REIS, M. S.; MARIOT, A. e STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. p. 48. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. 1112p. 2007
106. RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado.. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (eds.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa. p. 87-166. 1998.
107. RITTO, J. L. A. **Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de algodãozinho-do-campo, *Cochlospermum regium* (Mart et Schr.) Pilger**. 1996. 112p. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 1996.
108. RITTO, J. L. A.; OLIVEIRA, F.; CARVALHO, J. E.; DIAS, P. D. Avaliação farmacológica do extratos fluido de *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr.) Pilger. **LECTA-USF**. v. 14, n.2, p.27-36. Bragança Paulista. 1996.
109. RITTO, J. L. A. e KATO, E. T. M. Estudo morfohistológico de raízes de algodãozinho-do-campo. *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr.) Pilger. **LECTA-USF**. v. 16, n.2, p.97-109. Bragança Paulista. 1998.
110. RHODIN, A. Conservation International do Brasil. Prioridades de conservação <http://conservation.org.br/como/index.php?id=8>, acesso em 24/08/2009.
111. ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. Tradução: Jairo Kenupp Bastos. São Paulo: Ed. Premier, 1997. 372p.
112. RODRIGUES, F. C.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; STRINGHETA, P. C.; FERREIRA JUNIOR, D. B. Efeitos da Naringenina e da Bixina Sobre o Metabolismo Lipídico de Coelho. **NewsLab** - edição 81 - 2007. Disponível em: <http://www.newslab.com.br/newslab/pdf/artigos81/art03/art03.pdf>. Acesso em: 26/10/2009.
113. RODRIGUES, V. E. G. e CARVALHO, D. A. **Plantas Medicinais nos Domínios dos Cerrados**. Ed. UFLA. Lavras. 2001. 180p.

114. SÁNCHEZ-SALGADO, J. C.; ORTIZ-ANDRADE, R. R.; AGUIRRE-CRESPO, F.; VERGARA-GALICIA, J. ; LEÓN-RIVERA, I. ; MONTES, S.; VILLALOBOS-MOLINA RUA E ESTRADA-SOTO, S. Hypoglycemic, vasorelaxant and hepatoprotective effects of *Cochlospermum vitifolium* (Willd.) Sprengel: A potential agent for the treatment of metabolic syndrome. **Journal of Ethnopharmacology** . v. 109. n.3, p. 400-40. 2007.
115. SANTANA, H. M. P. e LACERDA, M. P. C. Solos representativos do estado do Tocantins sob vegetação natural do cerrado. **IX Simpósio Nacional do Cerrado**. Brasília. 2008.
116. SANT'ANA, P. J. P. E ASSAD, A. L. D. Programa de pesquisa em produtos naturais: a experiência da CEME. **Química Nova**, Vol. 27, No. 3, 508-512, 2004.
117. SANTOS, D. B. **Avaliação da atividade mutagênica e anti-mutagênica do extrato de *Cochlospermum regium* Mart. (algodãozinho do campo) pelo teste de micronúcleos em camundongos**. 2002. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás. Goiânia-GO. 67p. 2002
118. SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. p. 403-6 ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. 1112p.
119. SANTOS NETO, M. **Avaliação das atividades analgésica, antiinflamatória e antipirética do extrato hidroalcoólico bruto de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger em ratos**. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Goiás, a Universidade Estadual de Goiás e o Centro Universitário de Anápolis. Goiânia-GO. 2009.
120. SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de Origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. p. 375. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. 1112p.
121. SILVA, F. M. **Potencial antifúngico de extratos de plantas medicinais do cerrado brasileiro**. 2008. 222 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas)-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
122. SIMÕES, C. M. O. e SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira Farmacognosia**. Vol. 12 nº1. p. 35-40. 2002.
123. SIQUEIRA, J. C. **Plantas medicinais identificação e uso das espécies dos cerrados**. Ed. Loyola. 1988. S. Paulo. 39 p.
124. SISTEMA DE INFORMACIÓN BOTÁNICO - FLORA DEL PARAGUAY (SIB - FdP). Flora del Paraguay. **Conservatoire et Jardin Botaniques**, Ville de Genève (Suiza) y Missouri Botanical Garden, Saint-Louis, MO (USA). 2007. Disponível em: http://www.ville-ge.ch/cjb/fdp/claves/claves_frame.html. Acesso em: agosto de 2009.

125. SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookmann. p.621-647. 2002.
126. SKORUPA, L. A.; VIEIRA, R. F. Coleta de germoplasma de plantas medicinais. In: WALTER, B. T.; CAVALCANTI, T. B. (org.). **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 435-468, 2005.
127. SOH, P. N. E BENOIT-VICAL, F. Are West African plants a source of future antimalarial drugs?. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114. n.2, p. 130-140. 2007.
128. SÓLON, S.; BRANDÃO, L. F.G. e SIQUEIRA, J. M. o gênero *Cochlospermum* Kunth com ênfase nos aspectos etnobotânicos, farmacológicos, toxicológicos e químicos de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Vol. VI (3), 1 - 22, 2009.
129. SOUSA, M. M.; CRUZ, A. B.; SCHUHMACHER, M. B.; KREUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; CRUZ, R. C. B. Capítulo 3: Métodos de Avaliação de Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B. e CECHINEL FILHO, V. (org.). **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos** 1 ed. Editora do Vale do Itajaí: UNIVALI. 2003, p.25-30.
130. TOLEDO, M. I. **Avaliação da Toxicidade da espécie *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger**. 1996. 92p. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil, 1996.
131. TREVERZOL, M. I.; PAULA, J. R.; RICARDO, A. F.; FERREIRA, H. D.; ZATA, D. T. estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia – GO e cidades vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, 23-28, 2006. Disponível em: <http://www.farmacia.ufg.br/revista>. Acesso em: março de 2007.
132. TUROLLA, M. S. R. e NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 42, n.2, p. 289-306. 2006.
133. UNITINS/MS/MMA – FMT-TO, 1998. Levantamento Etnobotânico e Etnobofarmacológico do Projeto Bosque da Biodiversidade da Universidade do Tocantins (UNITINS), / Ministério da Saúde (MS) / Ministério do Meio Ambiente (MMA) – convênio com a Fundação de Medicina Tropical do Tocantins (FMT- TO). Pesquisa não publicada, pertencente ao banco de dados da FMT- TO.
134. VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. e MACIEL, M. A. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. vol. 28 n.º.3 p. 519-528. São Paulo, 2005.
135. VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S e BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, vol. 29, No. 2, 326-337, 2006.
136. VIEIRA, R. F.; SILVA, S. R.; ALVES, R. B. N; SILVA, D. B.; DIAS, T. A. B.; WRTZEL, M. M. V. S.; UDRY, M. C.; MARTINS, R. C. (Ed.) **Estratégias para a conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: resultados da 1ª**

- reunião Técnica.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: IBAMA, Biblioteca: CPACT. Brasília, DF. 2002. 184 p.
137. VINOD, V. T. P.; SASHIDHAR, R. B.; SREEDHAR, B.; RAO, B. R.; RAO, T. N. e ABRAHAM, J. T. Interaction of Pb²⁺ and Cd²⁺ with gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): A natural carbohydrate polymer with biosorbent properties. **Carbohydrate Polymers.** Article in Press, Accepted Manuscript. 2009.
138. VINOD, V. T. P.; SASHIDHAR, R.B.; SURESH,K.I.; RAO, B. R.; VIJAYA SARADHI, U. V. R. E RAO, T. P. Morphological, physic-chemical and structural characterization of gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): A tree gum from India. **Food Hydrocolloids.** Vol. 22, n. 5. p. 899-915. 2008.
139. VOGT, C. 2001. Fármacos e medicamentos: urgências. **Consciência.** Disponível em: <http://www.comciencia.br>. Acessado em agosto 2009.
140. VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C.; WENIGER, B.; OUATTARA, M.; KAMENAN, F. T.B. A.; LOBSTEIN, A. BRUN, R. E ANTON, R. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected Ivorian plants. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 87.n.2-3, p. 221-225. 2003.
141. YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C. e CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova.** vol.24, nº 1, p. 147-152. São Paulo. 2001.
142. YUNES, R. A. e CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental: In: R. A. YUNES, J. B. CALIXTO, **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna.** Chapecó-SC, Argus, 2001, 523 p.
143. YUNES R.A e CALIXTO J. B. Prefácio. In: **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** Chapecó: Argos. 2001. 523 p.
144. WAGNER J. D. A. A importância dos produtos de origem natural no atendimento à saúde. **Fórum de Debates – Fitomedicamentos e Produtos Naturais.** São Paulo, Brasil. 2002.
145. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO police perspectives on medicines.** Geneva: World Health Organization. 2002.
146. WORLD WILDLIFE FUND – BRASIL. WWF-BRASIL – Cerrado. Disponível em: http://www.wwf.org.br/informacoes/questoes_ambientais/biomas/bioma_cerrado/. Acesso em: setembro/2009.