

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
	2.1 OBJETIVO GERAL	15
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
	3.1 ASPECTOS TAXONÔMICOS DAS ESPÉCIES EM ESTUDO	16
	3.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS E USOS POPULARES DE <i>M. laevigata</i> E <i>M. glomerata</i>	18
	3.3 A QUÍMICA DO GÊNERO <i>Mikania</i>	25
	3.4 CONTROLE DE QUALIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS	33
	3.5 QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>M. laevigata</i> E <i>M. glomerata</i>	35
	3.6 MANEJO AGRONÔMICO DE PLANTAS MEDICINAIS	41
	3.7 QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE PLANTAS MEDICINAIS	43
4	PARTE EXPERIMENTAL	47
	4.1 EQUIPAMENTOS	47
	4.2 SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA E SOLVENTES	48
	4.3 MATERIAIS DE CONSUMO	49
	4.4 SOLUÇÕES REVELADORAS EMPREGADAS EM CCD	51
	4.4.1 Reagente de Liebermann-Burchard	51
	4.4.2 Solução de anisaldeído	51
	4.4.3 Solução de NP/PEG	51
	4.4.4 Vapores de amônio	51
	4.5 IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DAS ESPÉCIES	51
	4.6 CULTIVO DAS ESPÉCIES	52
	4.7 PREPARO DOS EXTRATOS	53

4.8	FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS DE <i>M. laevigata</i> E <i>M. glomerata</i>	54
4.8.1	Concentração das frações	54
4.8.2	Monitoramento do fracionamento cromatográfico	54
4.8.3	Análises qualitativas por CLAE-FR	54
4.8.3.1	Preparo das amostras	55
4.8.3.2	Condições cromatográficas	55
4.8.4	Purificação por CLAE-FN em escala preparativa	55
4.8.5	Fracionamento cromatográfico e purificação de constituintes químicos de <i>Mikania laevigata</i>	56
4.8.5.1	Fracionamento do extrato bruto por filtração em sílica gel	56
4.8.5.2	Fracionamento do grupo LD _{1A} por filtração em sílica gel	57
4.8.5.3	Refracionamento do grupo L ₂ por CCS	57
4.8.5.4	Purificação do grupo L _{3H} por CCS	58
4.8.5.5	Refracionamento do grupo L _{3K} por CCS	59
4.8.5.6	Purificação do grupo L _{3N} por CCS	59
4.8.5.7	Purificação do grupo L _{4F} por CLAE-FN em escala preparativa	60
4.8.6	Fracionamento cromatográfico e purificação de constituintes químicos de <i>Mikania glomerata</i>	62
4.8.6.1	Fracionamento de G ₁	62
4.8.6.2	Purificação de G _{1A} (fração enriquecida em diterpenos caurânicos)	62
4.8.6.3	Fracionamento cromatográfico de G _{1B} por CCS	63
4.8.6.4	Fracionamento cromatográfico por CLAE-FR em escala preparativa do grupo CIN ₄ e do extrato G ₂ de <i>M. glomerata</i>	64
4.8.7	Pureza, caracterização físico-química e estrutural das substâncias isoladas	66
4.9	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS EM <i>M. laevigata</i> E <i>M. glomerata</i> POR CLAE-FR	66
4.9.1	Sistema cromatográfico	66
4.9.2	Material vegetal	66
4.9.3	Desenvolvimento do método analítico	67
4.9.3.1	Preparo das amostras	67
4.9.3.2	Preparo das soluções de referência	67
4.9.3.3	Desenvolvimento da condição cromatográfica	68
4.9.4	Otimização das condições de extração	70

4.9.5	Validação do método analítico	71
4.9.5.1	Condição cromatográfica estabelecida	71
4.9.5.2	Preparo das amostras	72
4.9.5.3	Preparo do <i>pool</i> de soluções de referência	72
4.9.5.4	Seletividade.....	73
4.9.5.5	Teste de adequação do sistema	73
4.9.5.6	Linearidade	73
4.9.5.7	Limite de quantificação	76
4.9.5.8	Limite de detecção	78
4.9.5.9	Estabilidade dos marcadores químicos.....	79
4.9.5.10	Precisão.....	79
4.9.5.11	Exatidão	79
4.9.5.12	Robustez	80
4.9.6	Variação sazonal dos teores de marcadores químicos em folhas de <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i> cultivadas sob três níveis de sombreamento	81
4.9.7	Estabilidade química das drogas vegetais <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i> durante armazenamento	82
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
5.1	ANÁLISE QUALITATIVA DE CONSTITUINTES QUÍMICOS EM <i>M. laevigata</i> E <i>M. glomerata</i>	84
5.2	CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA E ESPECTROMÉTRICA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>M. laevigata</i> E <i>M. glomerata</i>	85
5.2.1	LH₁A e L₃F (cumarina, 33)	85
5.2.2	E₆ (mistura β-sitosterol, 38, e estigmasterol, 34)	90
5.2.3	L₄H (ácido benzoilgrandiflórico, 39)	907
5.2.4	LC₃ (ácido cinamoilgrandiflórico, 4)	102
5.2.5	LC e GC (ácido caurenóico, 2)	110
5.2.6	Isolamento de derivados do ácido cinâmico de <i>M. glomerata</i>	115
5.3	DEFINIÇÃO DOS MARCADORES QUÍMICOS	118
5.4	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE CLAE-DAD PARA QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS EM <i>M. laevigata</i> E <i>M. glomerata</i>	119
5.4.1	<i>M. laevigata</i>	119
5.4.2	<i>M. glomerata</i>	128
5.4.3	Análise dos perfis cromatográficos	129
5.5	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO	130

5.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CLAE-DAD PARA QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS EM <i>M. laevigata</i>	134
5.6.1	Seletividade	134
5.6.2	Linearidade.....	136
5.6.3	Limite de quantificação.....	140
5.6.4	Limite de detecção.....	142
5.6.5	Estabilidade dos marcadores químicos.....	143
5.6.6	Precisão.....	144
5.6.6.1	Precisão intra-dia.....	144
5.6.6.2	Precisão inter-dia.....	145
5.6.7	Exatidão	147
5.6.8	Robustez.....	148
5.7	VARIAÇÃO SAZONAL DOS TEORES DE MARCADORES QUÍMICOS EM FOLHAS DE <i>M. laevigata</i> E <i>M. glomerata</i> , CULTIVADAS EM TRÊS NÍVEIS DE SOMBREAMENTO.....	149
5.8	ESTABILIDADE QUÍMICA DOS MARCADORES QUÍMICOS NAS DROGAS VEGETAIS <i>M. laevigata</i> E <i>M. glomerata</i> DURANTE ARMAZENAMENTO.....	162
6	CONCLUSÕES.....	172
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	173

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições extrativas e cromatográficas relatadas na literatura para o doseamento de marcadores químicos em folhas de <i>M. glomerata</i> e <i>M. laevigata</i> .	37
Tabela 2. Gradiente de eluição empregado para registro dos perfis comatográficos exploratórios por CLAE-FR.	55
Tabela 3. Fracionamento preliminar do extrato etanólico bruto de <i>M. laevigata</i> por filtração em sílica gel.	56
Tabela 4. Fracionamento do grupo LD ₁ A por filtração em sílica gel.	57
Tabela 5. Refracionamento cromatográfico do grupo L ₂ por CCS.	58
Tabela 6. Refracionamento do grupo L ₃ H por CCS.	58
Tabela 7. Refracionamento do grupo L ₃ K por CCS.	59
Tabela 8. Purificação do grupo L ₃ N por CCS.	60
Tabela 9. Fracionamento de G _{1B} em CCS.	64
Tabela 10. Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método por CLAE-FR para análises dos marcadores químicos de <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i> .	69
Tabela 11. Condições de extração avaliadas para <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i> .	70
Tabela 12. Programa de eluição estabelecido para a quantificação de marcadores químicos em folhas de <i>M. glomerata</i> e <i>M. laevigata</i> .	72
Tabela 13. Correspondência entre os volumes e as massas injetadas para construção da curva analítica do ácido <i>o</i> -cumárico, conforme a concentração da solução de referência.	74
Tabela 14. Correspondência entre os volumes e as massas injetadas para construção da curva analítica da cumarina, conforme a concentração da solução de referência.	75
Tabela 15. Correspondência entre os volumes e as massas injetadas para construção da curva analítica do ácido benzoilgrandiflórico, conforme a concentração da solução de referência.	75
Tabela 16. Correspondência entre os volumes e as massas injetadas para construção da curva analítica do ácido cinamoilgrandiflórico, conforme a concentração da solução de referência.	76

Tabela 17. Correspondência entre os volumes e as massas injetadas para construção da curva analítica do ácido caurenóico, conforme a concentração da solução de referência.....	76
Tabela 18. Correspondência entre os volumes e as massas injetadas de soluções de referência para determinação do limite de quantificação dos marcadores químicos de <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i>	78
Tabela 19. Correspondência entre os volumes e as massas das substâncias de referência adicionadas às drogas vegetais nos estudos de exatidão (recuperação) dos marcadores químicos em <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i>	80
Tabela 20. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹³ C obtido para L ₃ F e comparação com dados relatados para a cumarina.....	89
Tabela 21. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹ H obtido para L ₃ F e comparação com dados da literatura para a cumarina.	89
Tabela 22. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹³ C obtido para E ₆ e comparação com dados da literatura para a mistura β-sitosterol e estigmasterol.	93
Tabela 23. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹ H obtido para E ₆ e comparação com dados relatados para β-sitosterol e estigmasterol.	96
Tabela 24. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹³ C obtido para L ₄ H.....	100
Tabela 25. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹ H obtido para L ₄ H e comparação com dados relatados para o ácido benzoilgrandiflórico.....	101
Tabela 26. Frequências de absorção e vibrações das bandas do espectro no IV obtido para LC ₃	104
Tabela 27. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹ H obtido para LC ₃ e comparação com dados relatados para o ácido cinamoilgrandiflórico.....	105
Tabela 28. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹³ C obtido para LC ₃ e comparação com dados da literatura.....	108
Tabela 29. Frequências de absorção e vibrações das bandas de GC do espectro no IV e comparação com dados relatados para o ácido caurenóico.....	111

Tabela 30. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para GC e comparação com dados relatados para ácido caurenóico.	113
Tabela 31. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H obtido para GC e comparação com dados relatados para o ácido caurenóico.....	115
Tabela 32. Programa de detecção empregado para registro de perfis cromatográficos e análise de marcadores químicos em folhas de <i>Mikania laevigata</i>	126
Tabela 33. Parâmetros de adequação do sistema determinados para as análises de marcadores químicos em folhas de <i>Mikania laevigata</i> , empregando a condição cromatográfica estabelecida.....	127
Tabela 34. Parâmetros de adequação do sistema determinados para as análises de marcadores químicos em folhas de <i>Mikania glomerata</i> , empregando a condição cromatográfica estabelecida.....	129
Tabela 35. Condições extrativas ensaiadas durante o desenvolvimento do método para quantificação de marcadores químicos em <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i>	131
Tabela 36. Parâmetros de adequação do sistema determinados para as análises de marcadores químicos em folhas de <i>Mikania laevigata</i> , empregando a condição cromatográfica estabelecida.....	136
Tabela 37. Teores estimados dos marcadores químicos em <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i> para construção das curvas analíticas.	137
Tabela 38. Massa injetada, áreas médias ($n = 3$) e desvio padrão relativo das curvas analíticas, para cada marcador químico, nos dois dias de análise.....	138
Tabela 39. Resultados da regressão linear para curvas analíticas dos derivados cinâmicos, em dois dias consecutivos de análise.....	139
Tabela 40. Resultados da regressão linear para curvas analíticas dos diterpenos caurânicos, em dois dias consecutivos de análise.	140
Tabela 41. Áreas médias e desvios padrão relativos para os marcadores químicos empregados na determinação do limite de quantificação do método por CLAE-DAD.	141

Tabela 42. Limite de quantificação (LQ) dos marcadores químicos determinados pela equação de regressão e experimentalmente apartir dos valores de desvio padrão relativo das áreas dos picos.	141
Tabela 43. Limite de detecção (LD) dos marcadores químicos determinados pela equação de regressão e experimentalmente apartir da razão sinal/ruído.	142
Tabela 44. Teores percentuais e desvio padrão relativo de marcadores químicos <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i> utilizados para determinação da precisão intra-dia do método.....	144
Tabela 45. Valores de teores percentuais e desvio padrão relativo de marcadores químicos <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i> empregados para determinação da precisão inter-dia do método.	146
Tabela 46. Recuperação de derivados do ácido cinâmico e de diterpenos caurânicos nas folhas de <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i> (média, <i>n</i> = 3).....	147
Tabela 47. Análise de variância dos teores de cumarina em folhas de <i>M. laevigata</i> coletadas em diferentes épocas do ano e cultivadas sob três níveis de interceptação da radiação solar.	151
Tabela 48. Análise de variância do desdobramento dos níveis de sombreamento dentro das estações do ano para os teores de cumarina em folhas de <i>M. laevigata</i>	151
Tabela 49. Dados meteorológicos médios durante o período do estudo de variação sazonal de metabólitos em <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i>	152
Tabela 50. Análise de variância dos teores de ácido benzoilgrandiflórico em folhas de <i>M. laevigata</i> coletadas em diferentes épocas do ano e cultivadas sob três níveis de interceptação da radiação solar.....	156
Tabela 51. Valores de resolução cromatográfica entre os picos dos ácidos cinamoilgrandiflórico e calrenóico em <i>M. laevigata</i> , durante o armazenamento da droga vegetal.....	168
Tabela 52. Valores de resolução cromatográfica entre os picos dos ácidos cinamoilgrandiflórico e calrenóico em <i>M. glomerata</i> , durante o armazenamento da droga vegetal.....	168

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Mikania laevigata</i> - A. ramo; B. folha; C. capítulo, D. flor, E. corola; F. bráctea involucral; G. bractéola; B. <i>Mikania glomerata</i> - A. ramo; B. flor; C. capítulo, D. folhas, E. corola; F. bráctea involucral; G. bractéola.	18
Figura 2. Croqui da área experimental. MG: <i>M. glomerata</i> e ML: <i>M. laevigata</i>	53
Figura 3. Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico de <i>M. laevigata</i>	61
Figura 4. Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico de <i>M. glomerata</i>	65
Figura 5. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR para os extratos etanólicos de (A) <i>M. laevigata</i> e (B) G ₁ de <i>M. glomerata</i>	84
Figura 6. Cromatogramas e espectros no UV obtidos <i>on-line</i> por CLAE-FR para L ₃ F (A) e para a cumarina (B, substância de referência)... ..	86
Figura 7. Espectro de absorção no infravermelho obtido para L ₃ F.	87
Figura 8. Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT-135 de L ₃ F (50 MHz, CDCl ₃).	88
Figura 9. Espectro de RMN de ¹ H de L ₃ F (200 MHz, CDCl ₃).	90
Figura 10. Espectro de absorção no infravermelho obtido para E ₆	91
Figura 11. Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT-135 obtido para E ₆ (100 MHz, CDCl ₃).	92
Figura 12. Espectro de RMN de ¹ H obtido para E ₆ (400 MHz, CDCl ₃).	94
Figura 13. Cromatograma e espectro no UV obtido <i>on-line</i> por CLAE-FR para L ₄ H.	97
Figura 14. Espectro de absorção molecular obtido no infravermelho para L ₄ H.	98
Figura 15. Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT-135 obtido para L ₄ H (100 MHz, CDCl ₃).	99
Figura 16. Espectro de RMN de ¹ H obtido para L ₄ H (400 MHz, CDCl ₃).	102
Figura 17. Cromatograma e espectro no UV obtido <i>on-line</i> por CLAE-FR para LC ₃	103
Figura 18. Espectro de absorção no infravermelho obtido para LC ₃	104
Figura 19. Espectro de RMN de ¹ H obtido para LC ₃ (400 MHz, CDCl ₃).	106

Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 obtidos para LC_3 (100 MHz, CDCl_3).	107
Figura 21. Mapa de contornos obtido para LC_3 pelo experimento HMQC (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, CDCl_3).	109
Figura 22. Cromatogramas e espectros no UV obtidos <i>on-line</i> por CLAE-FR para GC (A) e ácido caurenóico de referência (B).	110
Figura 23. Espectro de absorção no infravermelho obtido para GC.	111
Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 obtidos para GC (100 MHz, CDCl_3).	112
Figura 25. Espectro de RMN de ^1H obtido para GC (400MHz, CDCl_3).	114
Figura 26. Cromatogramas obtidos e espectros no UV obtidos <i>on-line</i> por CLAE-DAD para G_1 (A) e $\text{G}_{1\text{B}}$ (B).	116
Figura 27. Cromatogramas e espectros no UV obtidos <i>on-line</i> por CLAE-DAD para ácidos cinâmicos de referência.	117
Figura 28. Cromatograma e espectro no UV obtido <i>on-line</i> por CLAE-DAD para CIN4.	117
Figura 29. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para folhas de <i>Mikania laevigata</i> durante corridas exploratórias empregando ACN (A_1 e A_2) e MeOH (B) como modificadores orgânicos.	120
Figura 30. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para folhas de <i>Mikania laevigata</i> durante o desenvolvimento do método.	122
Figura 31. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para folhas de <i>Mikania laevigata</i> durante o desenvolvimento do método.	124
Figura 32. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para folhas de <i>Mikania laevigata</i> durante o desenvolvimento do método.	125
Figura 33. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para folhas de <i>Mikania laevigata</i> na condição N (condição estabelecida).	126

Figura 34. Cromatograma obtido por CLAE-DAD para folhas de <i>Mikania laevigata</i> usando a condição cromatográfica estabelecida.....	127
Figura 35. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para folhas de <i>Mikania glomerata</i> na condição cromatográfica estabelecida.....	128
Figura 36. Efeito de diferentes condições extrativas no rendimento de marcadores de <i>M. laevigata</i> (A) e <i>M. glomerata</i> (B).....	132
Figura 37. Efeito de diferentes ciclos de extração no rendimento de marcadores de <i>M. laevigata</i> (A) e <i>M. glomerata</i> (B), por sonicação com etanol.....	133
Figura 38. Cromatograma obtido por CLAE-DAD, para extrato etanólico de folhas de <i>M. laevigata</i> para avaliação da seletividade dos marcadores químicos.....	135
Figura 39. Média das curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD, em dois dias consecutivos, para os derivados cinâmicos.....	139
Figura 40. Média das curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD, em dois dias consecutivos, para os diterpenos caurânicos.....	139
Figura 41. Teores médios ($n = 6$ para cada matriz) dos marcadores químicos durante a avaliação da estabilidade dos marcadores químicos nas amostras preparadas de <i>M. laevigata</i> (A) e <i>M. glomerata</i> (B) a temperatura ambiente (23 ± 2 °C), por até 42 h.....	143
Figura 42. Influência de analistas, lote de coluna e temperatura na robustez do método para quantificação dos marcadores químicos em folhas <i>M. laevigata</i> (média, $n = 6$).....	148
Figura 43. Influência de analistas, lote de coluna e temperatura na robustez do método para quantificação de marcadores químicos em folhas <i>M. glomerata</i> (média, $n = 6$).....	149
Figura 44. Variação sazonal e do cultivo sob diferentes níveis de sombreamento nos teores médios (%) de cumarina em folhas de <i>M. laevigata</i>	152
Figura 45. Teores (%) sazonais de cumarina em folhas de <i>M. laevigata</i> , cultivadas sob diferentes níveis de sombreamento.....	153
Figura 46. Variação sazonal e do cultivo sob diferentes níveis de sombreamento nos teores médios (%) de ácido benzoilgrandiflórico em folhas de <i>M. laevigata</i>	155

Figura 47. Teores (%) de ácido benzoilgrandiflórico nas folhas de <i>M. laevigata</i> , cultivadas a pleno sol.....	155
Figura 48. Variação sazonal e do cultivo sob diferentes níveis de sombreamento nos teores médios (%) de ácido benzoilgrandiflórico em folhas de <i>M. glomerata</i>	157
Figura 49. Variação sazonal e do cultivo sob diferentes níveis de sombreamento nos teores médios (%) de ácido cinamoilgrandiflórico em folhas de <i>M. laevigata</i>	157
Figura 50. Variação sazonal e do cultivo sob diferentes níveis de sombreamento nos teores médios (%) de ácido cinamoilgrandiflórico em folhas de <i>M. glomerata</i>	158
Figura 51. Teores (%) sazonais de ácido cinamoilgrandiflórico nas folhas de <i>M. glomerata</i> , cultivadas a pleno sol.	158
Figura 52. Variação sazonal e do cultivo sob diferentes níveis de sombreamento nos teores médios (%) de ácido caurenóico em folhas de <i>M. laevigata</i> (A) e <i>M. glomerata</i> (B).....	159
Figura 53. Teores (%) sazonais de ácido caurenóico nas folhas de (A) <i>M. laevigata</i> e (B) <i>M. glomerata</i> , cultivadas sob diferentes níveis de sombreamento.....	160
Figura 54. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para o extrato etanólico de folhas de <i>M. glomerata</i> durante armazenamento para avaliação de estabilidade de marcadores químicos.....	163
Figura 55. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para o extrato etanólico de folhas de <i>M. laevigata</i> durante armazenamento para avaliação de estabilidade de marcadores químicos.....	164
Figura 56. Espectros no ultravioleta registrados <i>on-line</i> pelo detector de DAD na porção ascendente e descendente do pico da cumarina nos cromatogramas da Figura 55.....	165
Figura 57. Teores médios (%) dos marcadores químicos em folhas de <i>M. laevigata</i> cultivadas sob diferentes níveis de sombreamento e armazenadas para avaliação de estabilidade de marcadores químicos.....	166
Figura 58. Sequência de reações enzimáticas propostas para conversão de cumarina em ácido melilótico.....	167

Figura 59. Espectros no ultravioleta registrados *on-line* pelo detector de DAD na porção ascendente e descendente do pico do ácido benzoilgrandiflórico nos cromatogramas da figura 55.....169

Figura 60. Teores médios (%) dos marcadores químicos em folhas de *M. glomerata* cultivadas sob diferentes níveis de sombreamento e armazenadas para avaliação de estabilidade de marcadores químicos.....170

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	acetonitrila
ANAVA	análise de variância
<i>ent</i>	enantio
v/v	volume por volume
°INPM	grau alcoólico INPM (quantidade em gramas de álcool absoluto contida em 100 gramas de mistura hidroalcoólica)
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FN	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase normal
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
CLAE-DAD	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjos de diodos
CLAE-DAD-EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjos de diodos e de espectrometria de massas
CCS	cromatografia aberta em coluna de sílica gel
DAD	detector de arranjos de diodo
d.i.	diâmetro interno
DPR	desvio padrão relativo
EtOAc	acetato de etila
EtOH	etanol
Et ₂ O	éter etílico
DEPT	<i>Distortioless Enhancement by Polarization</i> (aumento da distorção por transferência de polarização)

DCM	diclorometano
g	aceleração gravitacional (980 cm/s ²)
HMQC	<i>Heteronuclear Correlation through Multiple Quantum Coherence</i> (Coerência heteronuclear em múltiplo quantum)
HX	<i>n</i> -hexano
IV	infravermelho
J	constante de acoplamento escalar
λ_{\max}	comprimento de onda máximo
ν_{\max}	número de onda máximo
MeOH	metanol
<i>n</i>	número de repetições
ODS	octadecilsilano
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
FR	Fase reversa
Rf	fator de retenção
TR	tempo de retenção
UV	ultravioleta

LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS

(1)	ent-caur-16-en-19-ol	25
(2)	ácido ent-caur-16-en-19-óico (ácido caurenóico)	25
(3)	ácido ent-15 β -hidróxi-caur-16-en-19-óico	25
(4)	ácido ent-15 β -cinamoilóxi-caur-16-en-19-óico (ácido cinamoilgrandiflórico)	25
(5)	ácido ent-7 α -cinamoilóxi-15 β -hidróxi-caur-16-en-19-óico	25
(6)	ácido ent-15 β -cinamoilóxi-7 α -hidróxi-caur-16-en-19-óico	25
(7)	ácido ent-15 β -hidróxi-7 α -(E)-lacnofiloiloxi-caur-16-en-19-óico	25
(8)	ácido 2 β ,16 α ,17-triidróxi-ent-cauran-19-óico	26
(9)	ácido 3 β ,16 α ,17-triidróxi-ent-cauran-19-óico	26
(10)	ácido 11 α ,15 β -diidróxi-7-O- β -D-glicopiranosil-ent-caur-16-en-19-óico	26
(11)	ácido 1 α ,15 β -diidróxi-7-O- β -D-glicopiranosil-ent-caur-16-en-19-óico	26
(12)	ácido labda-8(17),12,14-trien-19-óico	26
(13)	ácido labda-12 α -epóxi-8(17),14-dien-19-óico	26
(14)	ácido labda-12 β -epóxi-8(17),14-dien-19-óico	26
(15)	ácido labda-8(17),13(16),14-trien-19-óico	26
(16)	ácido labda-12,13-diidróxi-8(17),14-dien-19-óico	26
(17)	ácido labda-12,15-epóxi-8(17),13-dien-19-óico	26
(18)	éster metílico do ácido pimara-9(11),15-dien-19-óico	27
(19)	ácido eritroxila-3,15-dien-19-óico	27
(20)	2 α -acetóxi-15-isovaleril-miguanina	27
(21)	1- α -metóxi-15-isobutirilóxi-9-oxo-germacra-4-E,10(14),11(13)-trien-12,6 α -olídeo	27
(22)	15-isovalerilóxi-4 β ,5 α -epoxigermacra-1(10)E,11(13)-dien-12,8 α -olídeo	28
(23)	5 α -hidróxi-15-isobutirilóxigermacra-1(10)E,3Z,11(13)-trien-12,8 α -olídeo	28
(24)	mikagoianolídeo	28
(25)	1 β ,6 α -diidróxieudesm-4(15)-eno	28
(26)	eudesma-4(15),7(11)-dien-8 β ,12-olídeo	28
(27)	eudesma-4(15),7(11),8(9)-trien-12-olídeo	28
(28)	glicosídeo patuletina 3-O- β -D-6''-(p-cumaroil)	29
(29)	mikanina	29
(30)	nepetina	29
(31)	éster n-butílico do ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico	29

(32)	éster <i>n</i> -butílico do ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoilquínico	29
(33)	cumarina (1,2-benzopirona)	30
(34)	estigmast-22-en-3-ol	30
(35)	lupeol	30
(36)	ácido 15-isobutirilóxi-caur-16-en-19-óico	30
(37)	friedelina	31
(38)	β -sitosterol	31
(39)	ácido <i>ent</i> -15 β -benzoiloxi-caur-16-en-19-óico (ác. benzoilgrandiflórico)	31
(40)	ácido 17-hidróxi- <i>ent</i> -caur-15(16)-en-19-óico	31
(41)	ácido <i>ent</i> -beier-15(16)-en-19-óico	31
(42)	ácido <i>o</i> -cumárico (ácido <i>o</i> -hidróxicinâmico)	31
(43)	ácido 2- <i>trans</i> -cinamoil-2-acético	31
(44)	siringaldeído	31
(45)	óxido de cariofileno	32
(46)	espatulenol	32
(47)	α -pineno	32
(48)	β -cubebeno	32
(49)	DL-limoneno	32
(50)	α -elemeno	32
(51)	α -copaeno	32
(52)	β -elemeno	32
(53)	<i>trans</i> -cariofileno	32
(54)	α -humuleno	32
(55)	germacreno-D	32
(56)	biciclogermacreno	32
(57)	δ -cadineno	33
(58)	elemol	33
(59)	germacreno-B	33
(60)	epi- α -muurolol	33
(61)	δ -cadinol	33
(62)	campesterol	33
(63)	14-desóxi-11,12-didesidroandrografolídeo	45
(64)	neoandrografolídeo	45

(65)	andrografolídeo	45
(66)	quercetina	45
(67)	ácido <i>trans</i> -cinâmico (ácido <i>E</i> -fenil-2-propenóico)	107
(68)	penesteminosídeo	107
(69)	ácido melilótico	164
(70)	rutina	166

RESUMO

Mikania glomerata Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae), são plantas medicinais brasileiras indistintamente denominadas guaco. As folhas de ambas as espécies são utilizadas para o tratamento de afecções do trato respiratório, sendo a cumarina (**CO**) e diterpenos caurânicos considerados os constituintes responsáveis pelos efeitos farmacológicos. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um método por CLAE-FR para a quantificação simultânea de derivados do ácido cinâmico e de diterpenos caurânicos nas drogas vegetais *M. laevigata* e *M. glomerata*, bem como avaliar nas espécies cultivadas a influência da radiação solar, da sazonalidade e da estabilidade sobre os teores de marcadores químicos. A definição dos marcadores químicos foi realizada por análises de *fingerprints* por CLAE-FR, isolamento dos constituintes majoritários nos extratos e dados da literatura para a composição química de ambas espécies. Os constituintes químicos **CO** e os ácidos *o*-cumárico (**OC**), benzoilgrandiflórico (**BA**), cinamoilgrandiflórico (**CA**) e caurenóico (**KA**), foram definidos como marcadores químicos de *M. laevigata*, enquanto apenas os diterpenos caurânicos (**BA**, **CA**, **KA**) foram definidos para as folhas de *M. glomerata*. Exceto o **OC**, todos os marcadores químicos foram isolados, purificados e caracterizados por técnicas espectroscópicas usuais (IV, RMN de ^{13}C e de ^1H). O método desenvolvido por CLAE-DAD apresentou ser uma técnica adequada para a quantificação simultânea dos cinco marcadores químicos nas folhas de *M. laevigata* e *M. glomerata*, empregando gradiente de eluição alternado de MeOH e ACN como modificadores orgânicos e detecção em três diferentes comprimentos de onda: 210 nm para **CO**, **OC**, **KA**; 230 nm para **BA**; e 270 nm para **CA**. O método extrativo empregou 1 g de folhas pulverizadas com etanol absoluto sob sonicação por 20 min (2 x 30 mL). Os extratos apresentaram estabilidade por 42 h, sob condições normais de laboratório (temperatura de 23 ± 2 °C). O método cromatográfico mostrou ser linear ($r^2 > 0,999$), preciso (DPR < 4,6%), exato [taxas de recuperação entre 99,9 e 105,3%, exceto para **CO** e **OC** em *M. glomerata* (73,2–91,6% e 86,3–117,4%, respectivamente)], robusto e específico para quantificação para os cinco marcadores químicos nas folhas de *M. laevigata* e *M. glomerata*. O método validado foi aplicado em análises sazonais e de estabilidade dos marcadores químicos em espécies de *M. laevigata* e *M. glomerata* cultivadas em diferentes níveis de sombreamento (0, 40 e 80%). Os resultados das análises mostraram diferenças marcantes entre as espécies, com presença de **BA**, **CA** e **KA** em ambas as espécies, e ausência de **CO** e **OC** em *M. glomerata*. **OC** foi detectado em *M. laevigata*, mas em teor abaixo do limite de quantificação (< 0,045 %) estabelecido pelo método, e somente, nas plantas cultivadas sob 80% de sombreamento e coletadas no outono. Nas folhas de *M. laevigata* foi observado teor máximo de $0,94 \pm 0,24$ % de cumarina na interação verão x 80% de sombreamento. Em ambas as espécies, os diterpenos caurânicos (**BA**, **CA**, **KA**), com exceção do **BA** em *M. glomerata*, apresentaram maiores teores nas plantas cultivadas sob radiação solar plena. A estabilidade dos marcadores químicos **BA**, **CA** e **KA** em *M. laevigata* e *M. glomerata* é afetada a partir do terceiro mês de armazenamento, e do marcador **CO**, na primeira espécie, a partir do sexto mês, indicada por variações nos *fingerprints* obtidos por CLAE-DAD e análises de pureza espectral dos picos correspondentes, que demonstraram a presença de interferentes e, conseqüentemente, perda de especificidade do método cromatográfico quantitativo.

ABSTRACT

Mikania glomerata and *Mikania laevigata* (Asteraceae) are Brazilian medicinal plants popularly named 'guaco'. The leaves of both species are used to treat respiratory diseases, with coumarin (**CO**) and kaurane-type diterpenes regarded as the bioactive constituents. The goal of the present study was to develop and validate a RP-HPLC method for the simultaneous quantification of cinnamic acid derivatives and kaurane-type diterpenes in the species, along with evaluating the influence of solar radiance, seasonal and stability on compound contents. Definition of chemical markers was accomplished by the analysis of RP-HPLC fingerprints, isolation of major constituents in the extracts and literature records for chemical composition of both species. Compounds **CO**, *o*-coumaric (**OC**), benzoylgrandifloric (**BA**), cinnamoylgrandifloric (**CA**) and kaurenoic (**KA**) acids were defined as chemical markers for *M. laevigata*, whereas solely the kaurane-type diterpenes (**BA**, **CA** and **KA**) were found in *M. glomerata* leaves. Except for *o*-coumaric acid, all chemical markers were isolated, purified and characterized by spectroscopic techniques (IR, ¹H and ¹³C NMR). The developed RP-HPLC method showed to be a suitable technique for simultaneous quantification of five chemical markers in *M. laevigata* and *M. glomerata* leaves with an alternating gradient elution of methanol and acetonitrile and detection was carried out by DAD at three different wavelengths: 210 nm for **CO**, **OC**, **KA**; 230 nm for **BA**; and 270 nm for **CA**. Sample extraction for analysis was carried out by sonication of the plant drug (1 g) with EtOH for 20 min (2 × 30 mL). The extracts showed good stability for 42 hours under normal laboratory conditions (temperature of 23 ± 2 °C). The method showed to be linear ($r^2 > 0.999$), precise (RSD < 4.6%), accurate [recovery was between 99.9 and 105.3%, except for **1** and **2** in *M. glomerata* (73.2–91.6% and 86.3–117.4%, respectively)], robust and specific for quantification of five chemical markers in *M. laevigata* and *M. glomerata* leaves. The method was applied to samples of both species for seasonal studies and evaluation of chemical markers stability in plants cultivated under different shading conditions (0%, 40% and 80%). Striking differences were observed between the species, with the presence of the kaurane-type diterpenes **BA**, **CA** and **KA** in both and the absence of the cinnamic acid derivatives **CO** and **OC** in *M. glomerata*. Significant differences were also found for the evaluated harvesting periods and cultivation environments. **OC** was only detected in *M. laevigata* in concentrations below the limit of quantification (< 0.045%), in plants cultivated under 80% shading, collected in the autumn. The average concentration of **CO** reached its maximum (0.94 ± 0.24 %) in the summer, in plants growing under 80% shading. In general, both species presented higher amounts of the kaurane-type diterpenes in plants cultivated under full sunlight, except for **BA** in *M. glomerata*. Altogether, the obtained results point out that the highest content of **CO** is reached in *M. laevigata* cultivated under 80% shading, preferentially harvested in the summer, but with reduced levels of kaurane-type diterpenes. On the other hand, *M. glomerata* shall be cultivated under full sunlight for maximum contents of the kaurane-type diterpenes. The stability of compounds **BA**, **CA** and **KA** in *M. laevigata* and *M. glomerata* is affected from the third month of storage, and for compound **CO**, in the first species, from the sixth month of storage, as demonstrated by RP-HPLC fingerprints and UV spectral data recorded on line for the peaks, indicating the presence of interferences and therefore implying in loss of specificity for the method.

1 INTRODUÇÃO

Espécies vegetais e produtos naturais têm fornecido soluções para muitas questões essenciais à humanidade. Além de fornecerem recursos à alimentação, moradia, vestuário, dentre outros usos, diversas enfermidades são tratadas empregando-se recursos naturais (SCHENKEL *et al.*, 2003). Estudos químicos e biológicos de espécies vegetais diversas resultaram em produtos importantes para a terapêutica. Aspirina, atropina, artemisinina, colchicina, digoxina, efedrina, morfina, pilocarpina, quinina, reserpina, taxol, vincristina e vimblastina são alguns poucos exemplos de fármacos oriundos de plantas medicinais, incorporadas à farmacoterapêutica moderna (GILANI; RAHMAN, 2005).

Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que mais de 80% da população de países em desenvolvimento dependem de plantas medicinais como fonte primária de recursos terapêuticos (WHO, 2002; KHAN, 2006). O uso de plantas medicinais é recomendado pela OMS, que estabelece diretrizes para seu emprego seguro, como alternativa terapêutica para populações de baixa renda (WHO, 2002). O uso da fitoterapia em programas de saúde pública vem crescendo no país a partir da aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, em 15 de dezembro de 2005 e, mais recentemente, pelo Decreto presidencial nº 5813, de 22 de junho de 2006, que aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (RODRIGUES; SANTOS, 2006; BRASIL, 2006a).

Nos últimos cinco anos, tem-se observado um crescimento expressivo no uso de produtos fitoterápicos, representando um mercado mundial de cerca de US\$ 60 bilhões/ano (LIU; WANG, 2008; NEW... 2006). No Brasil, esse segmento movimentou, no mesmo período, cifras em torno de R\$ 400 milhões, apresentando taxa de crescimento anual de 5-15% (LIU; WANG, 2008; FREITAS, 2007).

A vasta diversidade estrutural e a atividade biológica promissora de diversos produtos naturais têm atraído, cada vez mais, a atenção da indústria farmacêutica e da comunidade científica envolvida na pesquisa de novas entidades químicas (MYLES, 2003). Além dos estudos fitoquímicos e de atividade biológica, diversas espécies vegetais medicinais têm sido objeto de estudos ecológicos e agrônômicos, visando maximizar os processos de produção de biomassa vegetal e os teores das substâncias de interesse (REIS *et al.*, 2003).

Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos influenciam a qualidade final dos fitoterápicos. Destaca-se, por exemplo, a identificação botânica inequívoca da espécie,

variações edafoclimáticas e genéticas, bem como aquelas resultantes de técnicas de cultivo, colheita e pós-colheita (KHAN, 2006).

Agências de regulamentação de medicamentos, como a *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (FDA), Agência Européia para Avaliação de Produtos Medicinais (EMA) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), recomendam a análise de diversos parâmetros para certificar a qualidade de drogas vegetais e fitoterápicos (FDA, 2004; ONG, 2004; BRASIL, 2004). No Brasil, essa regulamentação se dá por meio de portarias, decretos e resoluções publicados pelo Ministério da Saúde/ANVISA. A resolução vigente é a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº48/2004, que estabelece parâmetros de qualidade, segurança e eficácia terapêutica para esses produtos (BRASIL, 2004).

Nesse contexto, o presente trabalho visa fornecer subsídios para o controle de qualidade da droga vegetal e o manejo agrônômico de duas espécies de guaco (*Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker e *Mikania glomerata* Sprengel) amplamente utilizadas no país com finalidades medicinais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da radiação solar e da sazonalidade sobre os teores de marcadores químicos em espécimes cultivados de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estabelecer perfis cromatográficos de referência, visando a caracterização farmacognóstica das drogas vegetais de *M. glomerata* e *M. laevigata*.

Isolar, purificar e caracterizar por técnicas cromatográficas e espectrométricas marcadores químicos de folhas de *M. glomerata* e *M. laevigata*.

Desenvolver e validar metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação simultânea de marcadores químicos (cumarina, ácido caurenóico e outros a serem definidos) em folhas de *M. glomerata* e *M. laevigata*.

Avaliar, quantitativamente, a variação sazonal dos principais marcadores químicos presentes em *M. glomerata* e *M. laevigata*, submetidas a três diferentes níveis de radiação solar.

Realizar estudos de estabilidade de marcadores químicos para a matéria-prima vegetal de *M. glomerata* e *M. laevigata*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS TAXONÔMICOS DAS ESPÉCIES EM ESTUDO

Mikania laevigata Schultz Bip. ex Baker e *Mikania glomerata* Sprengel são lianas pertencentes à família Asteraceae, tribo Eupatorieae e sub-tribo Mikanae (SUYENAGA *et al.*, 2002). As espécies são vulgarmente conhecidas como guaco, guaco do mato, coração de Jesus, guaco liso, guaco cheiroso, cipó caatinga e erva-de-cobra (NEVES; SÁ, 1991; SUYENAGA *et al.*, 2002).

O gênero *Mikania* Willd. possui distribuição pantropical, mas com extensões nas áreas temperadas da América e sudeste da África. Esse gênero apresenta cerca de 450 espécies, sendo que aproximadamente 200 ocorrem no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 1994; GILBERT *et al.*, 2004; RITTER; WAECHTE, 2004).

Mikania glomerata é muitas vezes confundida com *M. laevigata*, espécie próxima, principalmente porque pode apresentar variações na forma das folhas, geralmente daquelas localizadas próximo à inflorescência. Estas folhas apresentam-se ovaladolanceoladas, muito semelhantes às de *M. laevigata*. Estas duas espécies diferenciam-se, principalmente, pelo formato das folhas e pelo odor característico de cumarina, que normalmente permanece no material seco de *M. laevigata* (RITTER *et al.*, 1992; RITTER; MIOTTO, 2005).

M. laevigata ocorre desde São Paulo até o Rio Grande do Sul e está adaptada a climas sem deficiências hídricas e ambientes com pouca luminosidade (SIMÕES *et al.*, 1998; ANTONACIO; WISINIEWSKI, 1998). Caracteriza-se por ser trepadeira volúvel, com ramos cilíndricos, estriados, glabros. Apresenta folhas opostas, sem estípulas, ovalado-lanceoladas, 6,5-15 × 3-5,5 cm, margem inteira, base atenuada, ápice acuminado, glabras em ambas as faces, trinérveas a quinquerúveas. Capítulos sésseis dispostos em panículas de glomérulos densos, glabros. Bráctea subinvolucral estreitamente ovalada, junto às brácteas involucrais, 1-2 × 0,5 mm, margem inteira, às vezes ciliada, ápice acuminado, glabra a pouco pilosa. Brácteas involucrais estreitamente oblongas, base alargada, 3,5-5 × 1,2 mm, margem inteira, ápice obtuso, às vezes ciliado, glabras a pouco pilosas. Corola com tubo 1-1,5 mm de comprimento, limbo 2,8-3 mm de comprimento, lacínias 0,5-1,2 mm de comprimento. Cipselas 2,5-4 mm de comprimento, glabras. Pappus 4-6 mm comprimento, cerca de 50 cerdas (RITTER; MIOTTO, 2005).

M. glomerata ocorre na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai. No Brasil é encontrada nas regiões centro-oeste, nordeste, sudeste e sul, em bordas e no interior de matas (LUCAS,

1942; PIO CORRÊA, 1984; RITTER; MIOTTO, 2005). É uma trepadeira volúvel, com ramos cilíndricos, estriados, glabros. Folhas opostas, sem estípulas, ovaladas a lanceolado-hastadas, 3-5 lóbulos, 6-24 × 4-11 cm, margem inteira, base cordada a atenuada, ápice acuminado, glabras em ambas as faces, trinérveas a quinquenérveas. Capítulos sésseis dispostos em panículas de glomérulos densos. Bráctea subinvolucral ovalada, junto às brácteas involucrais, 1-2 × 0,7 mm, margem inteira, às vezes ciliada, ápice acuminado, glabrescente. Brácteas involucrais oblongas, 2,8-4,5 × 0,9-1,1 mm, margem inteira, ápice agudo a obtuso, às vezes ciliadas, alargadas na base, glabras a pouco pilosas. Corola com tubo 1-2 mm de comprimento, limbo 2,5-3 mm de comprimento, lacínias 0,5-1 mm de comprimento. Cipselas 2-4 mm de comprimento, glabras a pouco pilosas. Papus 4-5,5 mm de comprimento, cerca de 40 cerdas (RITTER; MIOTTO, 2005). Na Figura 1 estão representadas algumas características morfológicas de *M. laevigata* e *M. glomerata*.

Características anatômicas contrastantes podem ser encontradas em folhas de uma mesma planta expostas a regimes luminosos diferentes, pois a folha é um órgão que apresenta alta plasticidade fenotípica em resposta a fatores ambientais (BJORKAMN, 1981; TAIZ; ZEIGER, 2004). Alterações morfológicas e anatômicas foram observadas em folhas de *M. laevigata* cultivadas sob diferentes malhas coloridas, com nível de radiação de 50% de sombreamento e, em folhas de *M. glomerata* cultivadas em casa de vegetação, com redução da radiação solar incidente (0%, 30%, 50% e 70%), demonstrando a plasticidade adaptativa das folhas dessas espécies às diferentes condições de luminosidade (SOUZA *et al.*, 2007a; CASTRO *et al.*, 2006).

Em função disso, a morfologia foliar dessas espécies de guaco não pode ser usada para fins de diferenciação entre elas. Botanicamente, faz-se necessário analisar as inflorescências e aquênios para distinguí-las. No entanto, inflorescências e aquênios não fazem parte da droga vegetal, além de serem dependentes da época de floração e frutificação das espécies (RITTER *et al.*, 1992).

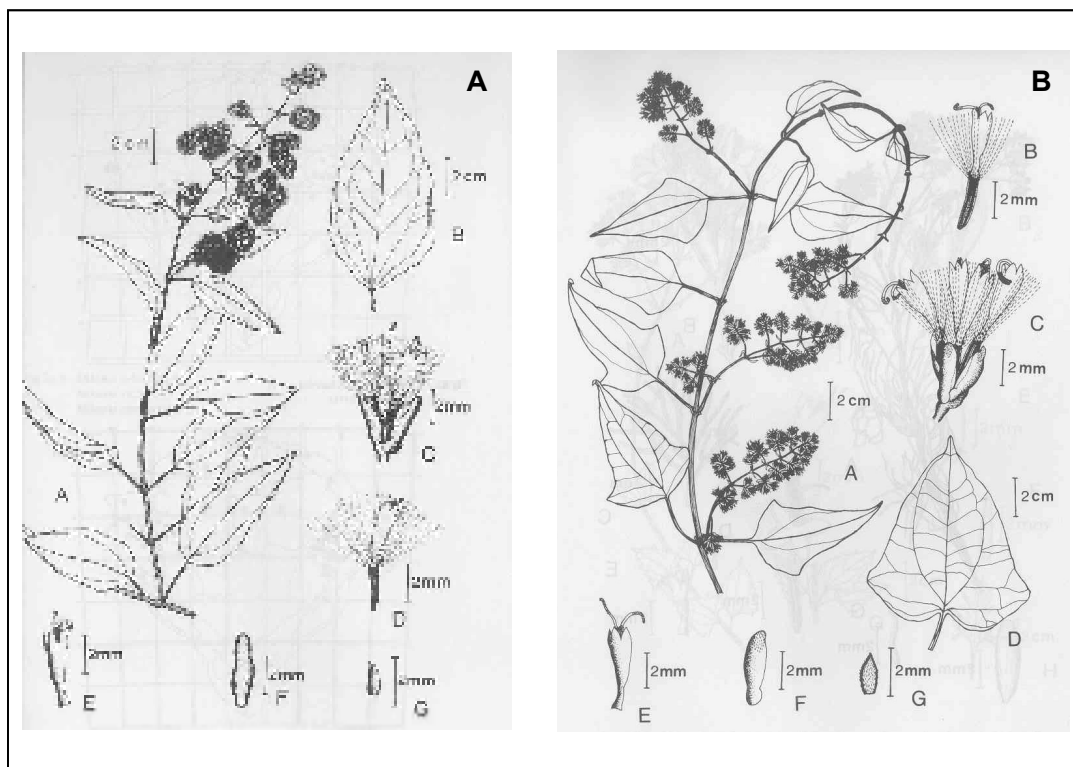


Figura 1. **A.** *Mikania laevigata*: A. ramo; B. folha; C. capítulo; D. flor; E. corola; F. bráctea involucrel; G. bractéola; **B.** *Mikania glomerata*: A. ramo; B. flor; C. capítulo; D. folhas; E. corola; F. bráctea involucrel; G. bractéola. **Fonte:** Ritter et al., 1992.

3.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS E USOS POPULARES DE *M. laevigata* E *M. glomerata*

Preparações fitoterápicas obtidas a partir das folhas de *M. laevigata* e *M. glomerata* são amplamente empregadas na medicina tradicional como antiinflamatório, broncodilatador e antiespasmódico (OLIVEIRA *et al.*, 1984; RUPPELT *et al.*, 1991; FIERRO *et al.*, 1999; MOURA *et al.*, 2002).

Estudos farmacológicos corroboram alguns dos usos populares das espécies. A atividade antiinflamatória *in vivo* de extratos fluidos de *M. glomerata* e *M. laevigata*, com teores alcoólicos de aproximadamente 22%, foi demonstrada em modelo de edema de pata de ratos induzido pela carragenina (OLIVEIRA *et al.*, 1985). Os extratos fluidos de *M. laevigata* e *M. glomerata*, administrados por via oral na dose de 5 mL/kg de peso corporal, reduziram o edema em 75,4% e 81,6%, respectivamente. Esses resultados diferiram estatisticamente do grupo controle negativo (tratado com etanol a 25%), mas não diferiram do grupo controle positivo (100 mg/kg v.o. de fenilbutazona). Ruppelt *et al.* (1991) relatou efeito de uma

infusão de folhas de *M. glomerata*, administrada por via oral na dose de 0,1 mL/10 g do camundongo, na redução de contrações induzidas por ácido acético (63%) e redução da difusão do corante azul de Evans no peritônio (48,92%), indicando ação analgésica superior à antiinflamatória. Posteriormente, Leite *et al.* (1993) demonstraram que o extrato hidroalcoólico a 50% de folhas de *M. glomerata*, administrado por via intraperitoneal na dose de 200 mg/kg, promoveu 60,8% de inibição do edema induzido por carragenina, enquanto que, na administração por via oral, foi obtida inibição de 37,7%. Segundo os autores, a cumarina administrada por via intraperitoneal, na dose de 5 mg/kg, reduziu o edema em 64,9%, e por via oral em 34,8%. A indometacina (5mg/kg), usada como controle positivo, apresentou inibição de 82,4 % (i.p.) e 53,6 % (v.o.).

Em ensaios envolvendo o sistema respiratório, Fierro *et al.* (1999) demonstraram que frações diclorometânicas de *M. glomerata* apresentaram inibição dose-dependente do processo inflamatório imunogênico, ao reduzir a infiltração leucocitária provocada pela injeção intrapleural de antígenos. Esses dados corroboram as indicações populares do guaco no tratamento de doenças alérgicas particulares ao sistema respiratório, como asma e bronquite. Em outro estudo, utilizando a mesma fração e modelo *in vivo* de pleurisia alérgica induzida por ovalbumina, os autores confirmaram a ação antialérgica de *M. glomerata*, que impediu a degranulação e migração de mastócitos por esse agente alergênico (FIERRO *et al.*, 1999).

Suyenaga *et al.* (2002), utilizando modelos de pleurisia e edema de pata de rato induzido por carragenina, observaram que a administração de decoctos das folhas de *M. laevigata* por via oral, na dose de 400 mg/kg de peso corporal, promoveu 102% de inibição do edema após 4 horas da administração do agente flogístico, sendo também observada 28% de inibição de migração leucocitária na cavidade pleural.

Efeito similar foi observado empregando-se modelo de edema na pata de ratos induzido por veneno de *Bothrops jararaca* (50 ng/g), em animais tratados com 150 µg de fração diclorometânica de extrato hidroalcoólico de *M. glomerata* por Kg de peso corporal (MOURA *et al.*, 2002).

De acordo com Santos *et al.* (2006), o modelo de pneumonite alérgica em camundongos é adequado para a avaliação de drogas ativas em doenças alérgicas pulmonares por mimetizar a asma humana. Esses autores avaliaram os efeitos produzidos pelo extrato

hidroalcoólico (1:2) de folhas de *M. laevigata* e constituintes isolados (ácido *o*-cumárico e cumarina) na inflamação alérgica em camundongos sensibilizados com uma mistura de ovoalbumina e hidróxido de alumínio. Os animais foram tratados por gavagem e as doses estabelecidas foram baseadas na recomendação de uso popular para um adulto, multiplicado por dez vezes devido às diferenças metabólicas. Os camundongos tratados com o extrato e com as substâncias isoladas apresentaram efeito antialérgico, evidenciado pela redução do influxo de leucócitos totais e de eosinófilos para o espaço broncoalveolar (SANTOS *et al.*, 2006).

A atividade broncodilatadora, principal indicação popular dos guacos, foi avaliada em alguns estudos (LEITE *et al.*, 1993; MOURA *et al.*, 2002; GRAÇA *et al.*, 2007a). Leite *et al.* (1993), empregando ensaios *in vitro* em preparações de traquéia isolada de cobaia, na ausência e presença de extratos hidroalcoólicos de folhas de *M. glomerata* (100 e 200 µg/mL), e na presença de solução de cumarina (2 µg/mL), observaram efeito dose-dependente de inibição das contrações induzidas por histamina. A contração da traquéia isolada de cobaia foi inibida pelos extratos e pela cumarina, apresentando valores de CI_{50} de 190 µg/mL e 3,57 µg/mL, respectivamente (LEITE *et al.*, 1993).

Posteriormente, Moura *et al.* (2002) sugeriram potencial efeito benéfico de *M. glomerata* no tratamento de doenças broncoconstritivas. Os autores avaliaram a atividade relaxante de extratos aquosos, hidroalcoólicos e fração diclorometânica do extrato hidroalcoólico em preparações de anéis de traquéia, leito mesentérico vascular e aorta isolados de cobaias e em anéis isolados de brônquios de pacientes pneumonectomizados com neoplasia pulmonar. O extrato hidroalcoólico provocou relaxamento dose-dependente na traquéia de cobaias pré-contraída com histamina (CI_{50} = 0,34 mg/mL), acetilcolina (CI_{50} = 0,72 mg/mL), ou potássio (CI_{50} = 1,41 mg/mL), assim como nos brônquios humanos pré-contraídos com potássio (CI_{50} = 0,34 mg/mL). A fração diclorometânica e o extrato hidroalcoólico induziram efeito relaxante dose-dependente em anéis de traquéia de cobaias contraídas com potássio (CI_{50} = 0,017 e 1,80 mg/mL, respectivamente). A administração da fração diclorometânica induziu efeito vasodilatador em preparações de aorta (CI_{50} = 0,249 mg/mL) e leito mesentérico vascular (CI_{50} > 0,3 mg/mL) pré-contraídos com noradrenalina. A partir desses resultados, Moura *et al.* (2002), sugeriram que o efeito broncodilatador da fração diclorometânica de *M. glomerata* é mais pronunciado do que o efeito vasodilatador, haja visto a menor afinidade do extrato pela musculatura lisa vascular, quando comparado com a

musculatura lisa respiratória. Esses autores relataram que estudos anteriores realizados por eles, mostraram que a cumarina possui um significativo efeito relaxante em preparações de traquéia isolada de cobaias, pré-contraídas com histamina, acetilcolina e potássio.

Graça *et al.* (2007a) observaram que o extrato hidroalcoólico de *M. laevigata* induziu relaxamento dose-dependente em preparações *in vitro* de traquéia de rato, sendo o efeito independente da presença ou ausência de agentes agonistas utilizadas na pré-contracção do epitélio. O efeito foi caracterizado como dependente de alterações na mobilização celular de cálcio, provavelmente com a participação direta dos canais de potássio (GRAÇA *et al.*, 2007a).

Resultados de ensaios de atividade antiulcerogênica de *M. laevigata* sugerem que o mecanismo envolvido na inibição da secreção gástrica poderiam, também, explicar o efeito broncodilatador da espécie (BIGHETTI *et al.*, 2005). O mecanismo anti-secretor do extrato hidroalcoólico a 70% e da cumarina isolada foi avaliado nas doses de 1000 e 100 mg/kg, respectivamente, a partir da hipersecreção ácida induzida por histamina, pentagastrina e betanecol, em modelo de ligação pilórica em ratos (BIGHETTI *et al.*, 2005). O bloqueio da atividade do betanecol pelo extrato e pela cumarina sugeriu mecanismo colinérgico, o qual está envolvido na contracção e secreção brônquica (BIGHETTI *et al.*, 2005).

A literatura referenciada aponta a cumarina como a principal responsável pelos efeitos broncodilatadores; porém, alguns autores sugerem que outros constituintes contribuam para essa atividade nos extratos de guacos (LEITE *et al.*; 1993; MOURA *et al.*, 2002; BIAVATTI *et al.*, 2004).

Trabalho recente demonstrou que diterpenos do tipo caurano também apresentam efeitos inibitórios na contratilidade e na indução do relaxamento na musculatura lisa (AMBROSIO *et al.*, 2006). Derivados caurânicos (ácidos caurenóico, cauradienóico, 16 α -hidróxi-*ent*-cauran-19-óico e seu éster metílico) isolados de *Oyedaea verbesinoides* exibiram efeito inibitório, em diferentes potências, na contratilidade uterina de ratas induzida por acetilcolina, ocitocina e serotonina (CAMPOS-BEDOLLA *et al.*, 1997). Os ácidos caurenóico e cauradienóico inibiram a contracção induzida pela acetilcolina em 52,8% e 79,7%, respectivamente. A contracção induzida pela serotonina foi inibida pelos ácidos cauradienóico e caurenóico em 68,6% e 100,0%, bem como pelo ácido hidróxi-*ent*-cauran-19-óico e seu éster metílico em 90,2% e 15,7%, respectivamente. A contracção induzida por ocitocina foi

inibida significativamente pelo ácidos cauradienóico e caurenóico (67,7% e 72,2%), quando comparada com o ácido grandiflorênico (13,9%) (CAMPOS-BEDOLLA *et al.*, 1997).

Cunha *et al.* (2001) demonstraram o efeito do ácido caurenóico isolado do óleo-resina de *Copaifera langsdorffi* Desf. no relaxamento da musculatura uterina de ratas, contraída por acetilcolina [10^{-4} M, E_{\max} (resposta contrátil máxima) = 87%]; ocitocina (10^{-9} M, E_{\max} = 90 %) e cloreto de bário (10^{-3} M, E_{\max} = 83 %), obtendo valores de CI_{50} para os antagonistas de 2,8; 3,4 e 5,0 mM, respectivamente. Ácido caurenóico, isolado de *Viguiera robusta* Gardn., na dose de 20,0 µg/mL apresentou 70% de inibição na contratilidade induzida *in vitro* em artéria carótida de ratos Wistar por fenilefrina (TIRAPELLI *et al.*, 2002).

Outras atividades farmacológicas avaliadas para as espécies incluem as ações antifídica e antimicrobiana. Extratos aquosos preparados a partir de folhas, caules e raízes frescos e secos de *M. glomerata* foram capazes de neutralizar, em ratos, os efeitos tóxicos induzidos pelos venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* (MAIORANO *et al.*, 2005). Os autores sugeriram que a espécie é uma fonte potencial de inibidores da fosfolipase A_2 , metaloproteases e serinoproteases, enzimas envolvidas na fisiopatologia de várias doenças de homens e animais (MAIORANO *et al.*, 2005).

A ação antimicrobiana foi avaliada em vários estudos (SANTOS *et al.*, 1998; DUARTE *et al.*, 2005; YATSUDA *et al.* (2005). O extrato em clorofórmio de partes aéreas de *M. glomerata* apresentou atividade inibitória *in vitro* de proliferação de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-29336) (SANTOS *et al.*, 1998). Entretanto, não foram informados a concentração inibitória mínima (CIM) e as doses ensaiadas. Em outro estudo *in vitro*, o óleo essencial de *M. laevigata* apresentou CIM de 0,25 mg/mL contra *Candida albicans* (ATCC 10231), enquanto o extrato alcoólico e óleo essencial de *M. glomerata* não apresentaram atividade frente a esse microorganismo (DUARTE *et al.*, 2005). Yatsuda *et al.* (2005) sugeriram que *M. laevigata* e *M. glomerata* são espécies promissoras para o desenvolvimento de agentes antibacterianos contra patógenos orais, com base na atividade antimicrobiana contra diferentes cepas de *Streptococcus mutans* apresentada por elas. A análise por GC-MS da fração hexânica metilada de *M. laevigata* acusou cumarina como sendo o componente principal desse extrato (40,08%). A fração hexânica de ambos extratos vegetais foi a mais efetiva em inibir o crescimento bacteriano das cepas ensaiadas, cujas CIM e CBM (concentração bactericida mínima) apresentaram valores entre 12,5 a 400 µg/mL e 25 a 400

µg/mL, respectivamente (YATSUDA *et al.*, 2005). Para a fração hexânica metilada de *M. glomerata* observou-se que, entre as substâncias majoritárias, cerca de 52% era ácido caurenóico. Esta fração apresentou CIM entre 12,5 a 25 µg/mL e CBM de 25 a 400 µg/mL (YATSUDA *et al.*, 2005).

Estudos visando avaliar a segurança de extratos fluídos de *M. glomerata* e *M. laevigata* também foram realizados. Em um estudo de toxicidade aguda em ratos Wistar machos, os extratos fluídos de *M. glomerata* e *M. laevigata*, administrados em dose única por via oral de 5 a 10 mL/kg, não causaram morte em nenhum dos animais (OLIVEIRA *et al.*, 1985). Na dose de 20 mL/kg, ambos extratos produziram efeito letal em 40% dos animais, no período de 24 h de observação, indicando baixa toxicidade desses extratos (OLIVEIRA *et al.*, 1985).

O efeito de superdosagem do extrato etanólico de *M. glomerata* foi avaliado durante o ciclo espermatogênico de ratos Wistar adultos (SÁ *et al.*, 2003). Os resultados mostraram que a administração de 1 mL do extrato, na dose de 3,3 g/kg de peso corporal, por 52 dias, não alterou a produção de gametas, níveis de testosterona sérica e ingestão de alimentos (SÁ *et al.*, 2003). O efeito mutagênico *in vivo* foi avaliado empregando-se as mesmas condições anteriores, não sendo observados efeitos genotóxicos nos animais tratados e nenhuma morte ou prejuízo à fixação e desenvolvimento dos embriões (SÁ *et al.*, 2006).

Estudos de Graça *et al.* (2007a) evidenciam a segurança do uso de xarope de guaco (*M. laevigata*) em ratos de ambos os sexos. A toxicidade aguda, crônica e subcrônica do xarope, contendo quantidades conhecidas de cumarina, foi avaliada por meio de administrações oral e intraperitoneal em ratos Wistar e camundongos Swiss de ambos os sexos (GRAÇA *et al.*, 2007a). A DL₅₀ calculada para a administração intraperitoneal foi de 0,904 g/kg, para ratos de ambos sexos, e de 0,967 e 0,548 g/kg, respectivamente para ratos machos e fêmeas. Já o valor de DL₅₀ obtido para a dose oral foi de 10g/kg do animal. Doses orais de 75, 150 e 300 mg/kg, repetidas por 28 ou 90 dias não produziram nenhum distúrbio em parâmetros hematológicos ou bioquímicos, nem evidenciaram toxicidade nos sistemas hepático, renal ou pancreático (GRAÇA *et al.*, 2007a). Nenhuma efeito tóxico na fertilidade de ratos Wistar foi observada em animais tratados, por gavagem, diariamente com xarope de *M. laevigata* (com concentrações de 3, 5, 7 e 14 mg/kg de cumarina) durante 90 dias (GRAÇA *et al.*, 2007b).

Ensaio clínico também foram realizados para o guaco, os quais foram publicados pelo Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da extinta Central de Medicamentos da ANVISA (1983 - 1987). Os resultados obtidos evidenciam as ações broncodilatadora e antitussígena do infuso de *M. glomerata* (BRASIL, 2006b). A ANVISA incluiu a *M. glomerata* na lista de registro simplificado de fitoterápicos (Instrução Normativa nº5/2008) com ação terapêutica broncodilatadora e expectorante (BRASIL, 2008).

Pelo exposto, é evidente o interesse da comunidade científica no guaco, sendo *M. glomerata* a espécie mais estudada. No entanto, *M. laevigata* e *M. glomerata* são frequentemente confundidas por apresentarem semelhanças anátomo-morfológicas, composição química e usos medicinais similares (OLIVEIRA *et al.*, 1984; REDHER *et al.*, 2000a; LIMA *et al.*, 2003a).

A espécie *M. glomerata*, oficializada como espécie medicinal na Farmacopéia Brasileira I, teve recentemente sua monografia substituída para *M. laevigata* na Farmacopéia Brasileira IV (F.BRAS. I, 1929; F.BRAS. IV, 2005). Antes da substituição da espécie na Farmacopéia Brasileira IV, alguns autores sugeriram a possível adulteração de *M. glomerata* com outras espécies de *Mikania* (CELEGHINI *et al.*, 1999; SHARAPIN *et al.*, 2000). Celeghini *et al.* (1999), após estudo de quantificação de cumarina em amostras comerciais de guaco nomeadas de *M. glomerata*, sugeriram tratar-se de substituição ou adulteração de *M. glomerata* por outras espécies de *Mikania*, cujo conteúdo em cumarina e perfis cromatográficos ainda não haviam sido estudados.

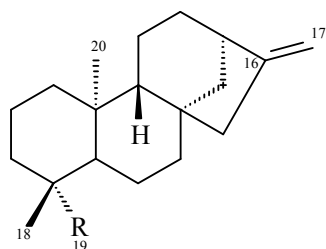
Segundo alguns autores, o uso indistinto de *M. glomerata* e *M. laevigata* se deve, a princípio, à similaridade anátomo-morfológica e propriedade organoléptica dessas, pois ambas podem apresentar variações na forma das folhas e odor característico de cumarina (REHDER *et al.*, 2000a; LIMA *et al.*, 2003a). Tal fato constitui um problema de saúde pública, haja visto que adulterações e falsificações são frequentes no segmento de fitoterápicos (ZAUPA *et al.*, 2000). Por tratarem-se de espécies distintas é provável que apresentem composições química qualitativa e quantitativa diferentes e, conseqüentemente, características farmacológicas diversas, as quais devem ser extensivamente investigadas.

3.3 A QUÍMICA DO GÊNERO *Mikania*

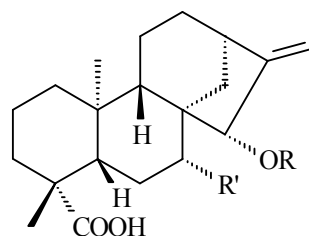
O gênero *Mikania* é composto por cerca de 450 espécies, com distribuição em regiões tropicais da América e sudeste da África. Destas, em torno de 200 são encontradas no Brasil (RITTER; WAECHTER, 2004).

As espécies do gênero *Mikania* apresentam uma composição química bastante peculiar, observando-se a predominância de lactonas sesquiterpênicas ou de ácidos diterpênicos, particularmente do tipo caurano (NUNEZ *et al.*, 2004). Algumas das espécies já estudadas foram: *M. oblongifolia* (VICHNEWSKI *et al.*, 1977), *M. officinalis*, *M. sessilifolia*, *M. luetzelburgii*, *M. belemii* (BOHLMANN *et al.*, 1981), *M. arrojadoi* (BOHLMANN *et al.*, 1982a), *M. glomerata*, *M. laevigata* (OLIVEIRA *et al.*, 1984), *M. lindbergii* (FABBRI *et al.*, 1997), *M. triangularis* (KNUDSEN *et al.*, 1986; CRUZ; ROQUE, 1992), *M. hookeriana* (REIS *et al.*, 2000) e *M. hirsutissima* (OHKOSHI *et al.*, 2004).

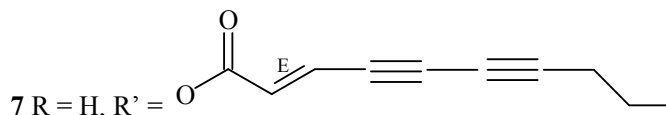
Das partes aéreas de *M. vitifolia* D.C. foram isolados sete diterpenos *ent*-caurânicos: *ent*-caur-16-en-19-ol (**1**) e os ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico (ácido caurenóico) (**2**), *ent*-15 β -hidróxi-caur-16-en-19-óico (**3**), *ent*-15 β -cinamoilóxi-caur-16-en-19-óico (ácido cinamoil-grandiflórico) (**4**), *ent*-7 α -cinamoilóxi-15 β -hidróxi-caur-16-en-19-óico (**5**), *ent*-15 β -cinamoilóxi-7 α -hidróxi-caur-16-en-19-óico (**6**) e *ent*-15 β -hidróxi-7 α -(*E*)-lacnofiloiloxi-caur-16-en-19-óico (**7**) (LOBITZ *et al.*, 1998).



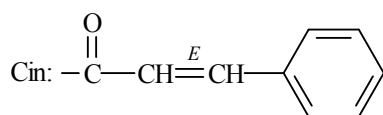
1 R = CH₂OH
2 R = COOH



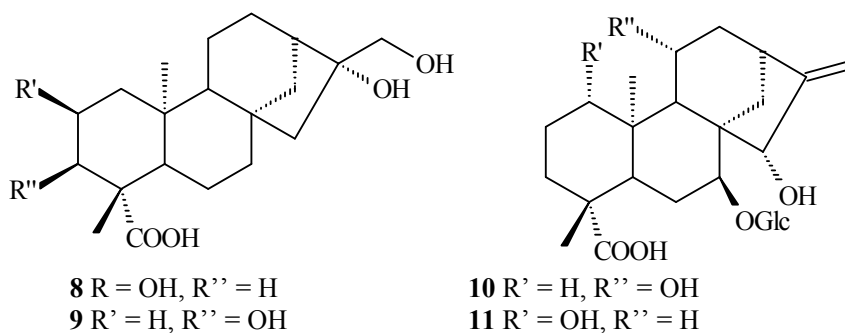
3 R = H, R' = H
4 R = Cin (cinamoila), R' = H
5 R = H, R' = OCin
6 R = Cin, R' = OH



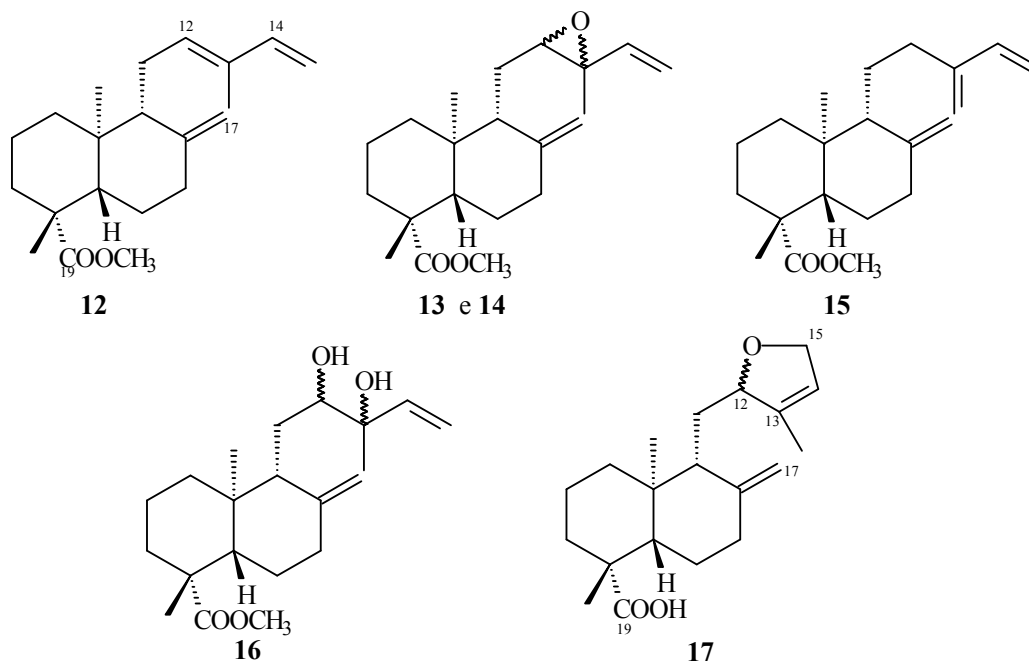
7 R = H, R' =

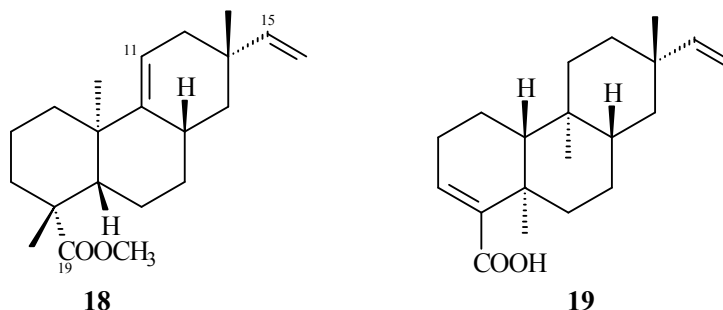


Derivados do ácido caurânico, respectivamente os ácidos 2 β ,16 α ,17-triidróxi-*ent*-cauran-19-óico (**8**), 3 β ,16 α ,17-triidróxi-*ent*-cauran-19-óico (**9**), 11 α ,15 β -diidróxi-7-*O*- β -D-glicopiranosil-*ent*-caur-16-en-19-óico (**10**) e 1 α ,15 β -diidróxi-7-*O*- β -D-glicopiranosil-*ent*-caur-16-en-19-óico (**11**), foram isolados do extrato em acetona:água 1:1 (v/v) de partes aéreas de *M. hirsutissima* D.C. (OHKOSHI *et al.*, 2004).



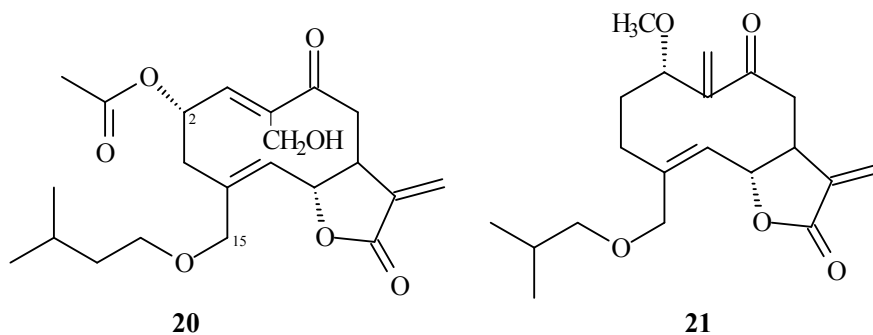
Diterpenos labdânicos foram obtidos do extrato diclorometânico de folhas de *Mikania* sp. nov, sendo eles os ésteres metílicos dos ácidos labda-8(17),12,14-trien-19-óico (**12**), labda-12 α -epóxi-8(17),14-dien-19-óico (**13**), labda-12 β -epóxi-8(17),14-dien-19-óico (**14**) labda-8(17),13(16),14-trien-19-óico (**15**), labda-12,13-diidróxi-8(17),14-dien-19-óico (**16**), além do ácido labda-12,15-epóxi-8(17),13-dien-19-óico (**17**). Também foram isolados da espécie o éster metílico do ácido pimara-9(11),15-dien-19-óico (**18**) e o ácido eritroxila-3,15-dien-19-óico (**19**) (NUNEZ *et al.*, 2004).

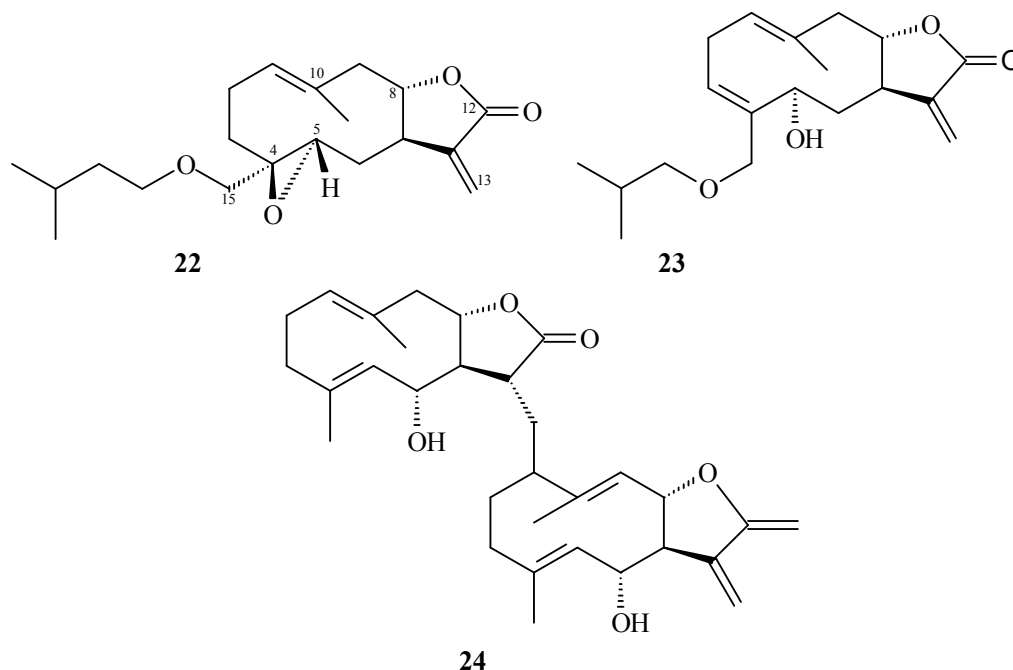




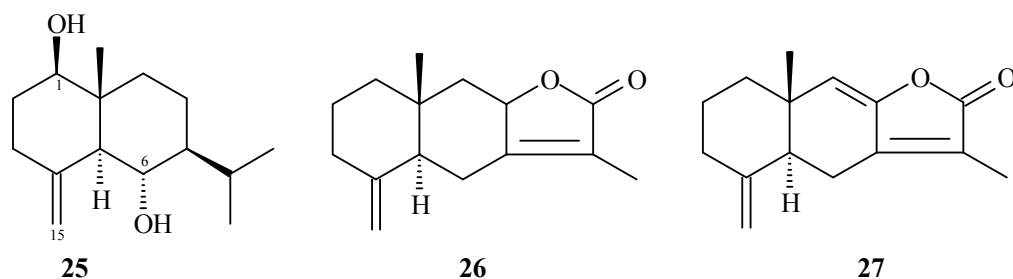
Nunez *et al.* (2004) sugerem que ácidos diterpênicos são os principais metabólitos de espécies brasileiras de *Mikania*, sendo possível sua divisão em dois grupos quimiotaxonômicos com base no esqueleto diterpênico: *ent*-cauranos ou labdanos/pimaranos. No entanto, menos de 10% das espécies conhecidas de *Mikania* foram estudadas quimicamente e nenhuma conclusão definitiva pode ser formada.

Outra classe de substâncias frequentes em espécies de *Mikania* são as lactonas sesquiterpênicas, especialmente as do tipo germacrano e eudesmano. Algumas espécies possuem germacranos altamente oxigenados, tais como 2 α -acetóxi-15-isovaleril-miguanina (**20**) e 1- α -metóxi-15-isobutirilóxi-9-oxo-germacra-4-*E*,10(14),11(13)-trien-12,6 α -olídeo (**21**), presentes em *Mikania guaco* Humb. ex Bonpl. (RÜNGELER *et al.*, 2001), 15-isovalerilóxi-4 β ,5 α -epoxigermacra-1(10)*E*,11(13)-dien-12,8 α -olídeo (**22**) e o 5 α -hidróxi-15-isobutirilóxi-germacra-1(10)*E*,3 Z ,11(13)-trien-12,8 α -olídeo (**23**) presentes em *Mikania holwayana* B. L. Robins (CASTRO *et al.*, 1989). Germacranolídeos diméricos como mikagoianolídeo (**24**) também já foram isolados de *M. goyazensis* (BOHLMANN *et al.*, 1982b).

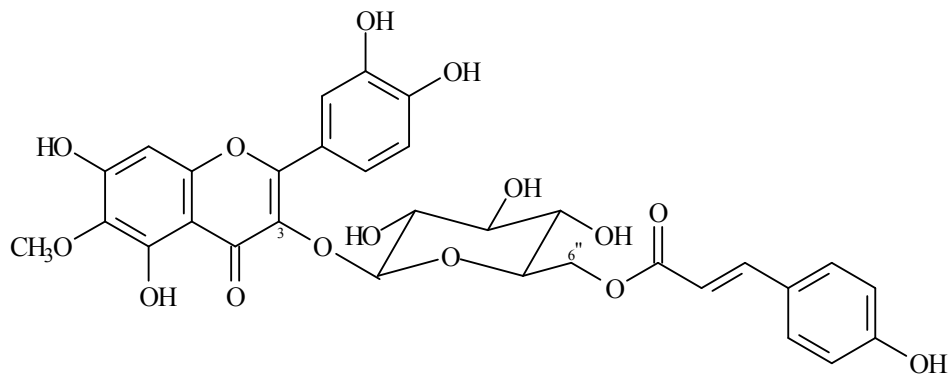




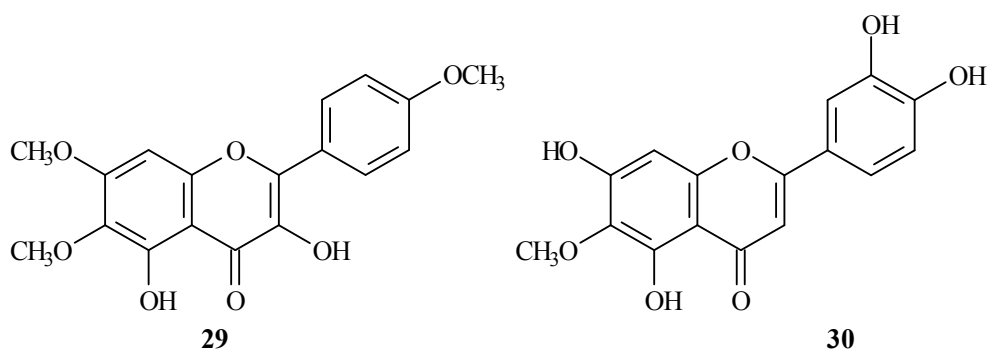
Sesquiterpenolactonas do tipo eudesmanolídeo foram isoladas de *Mikania banisteriae* D.C., incluindo 1 β ,6 α -diidróxieudesma-4(15)-eno (**25**); eudesma-4(15),7(11)-dien-8 β ,12-olídeo (**26**) e eudesma-4(15),7(11),8(9)-trien-12-olídeo (**27**) (LOBITZ *et al.*, 1997).



A presença de flavonóides e derivados do ácido dicafeoilquínico também foi relatada para espécies do gênero *Mikania*. Como exemplos de compostos destas classes citam-se glicosídeo patuletina 3-*O*- β -D-6''-(*p*-cumaroil) (**28**), mikanina (**29**) e nepetina (**30**) isolados de *M. cordata* (AGUINALDO *et al.*, 2003) e os ésteres *n*-butílicos dos ácidos 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (**31**) e 3,4-di-*O*-cafeoilquínico (**32**) isolados de *M. micrantha* (WEI *et al.*, 2004).

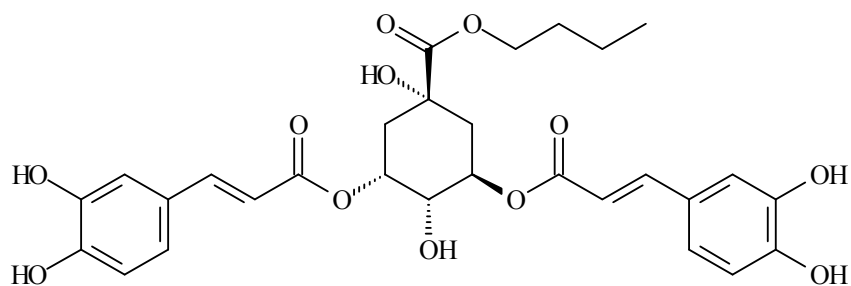


28

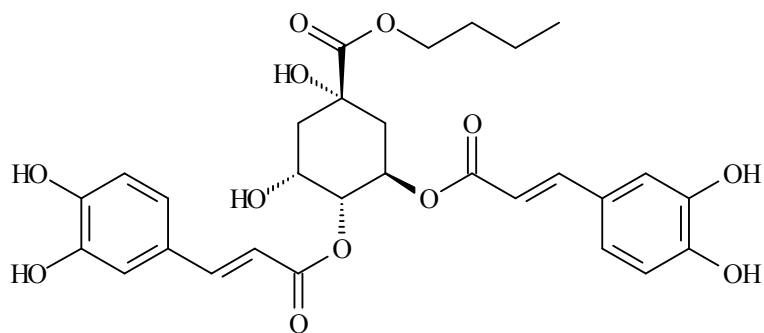


29

30

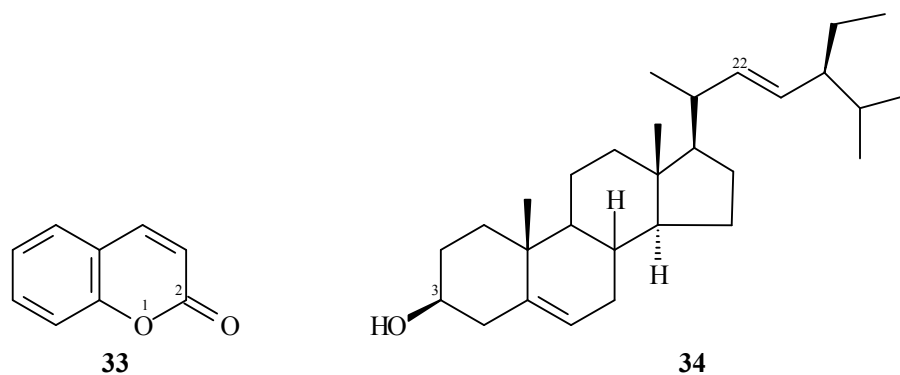


31

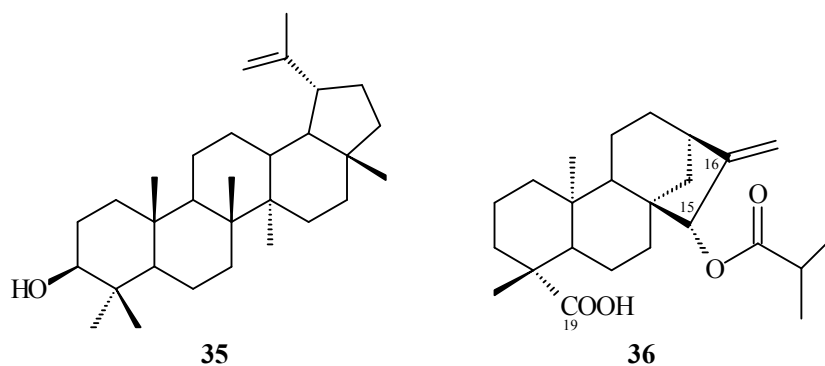


32

Em triagens fitoquímicas de partes aéreas de *M. glomerata* e *M. laevigata* foram identificadas as seguintes classes de metabólitos secundários: alcalóides, saponinas, óleo essencial, taninos e esteróides, não constatando a presença de antraderivados e flavonóides (OLIVEIRA *et al.*; 1984). Semelhante aos estudos farmacológicos, a espécie *M. glomerata* é a mais investigada em estudos químicos. Do extrato hexânico de *M. glomerata* os autores isolaram cumarina (1,2-benzopirona) (**33**) e estigmast-22-en-3-ol (**34**); já do extrato hexânico de *M. laevigata* além de **33** foram isolados os diterpenos caurênicos **2** e **4**.

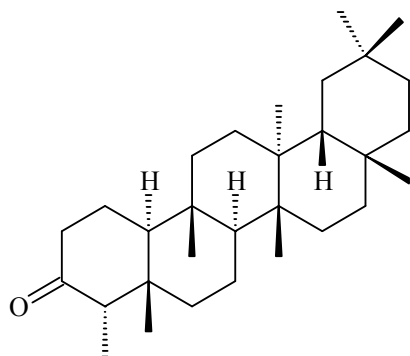
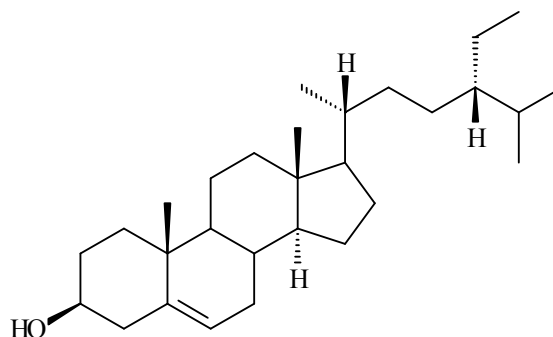
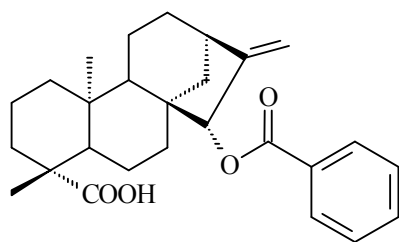
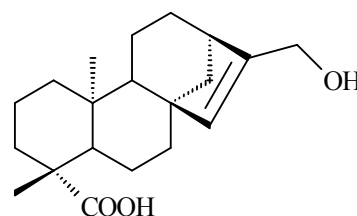
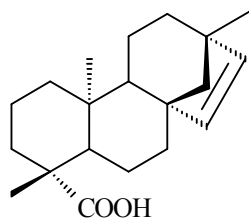
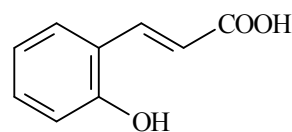


Santos *et al.* (1998) isolaram o triterpeno lupeol (**35**) e o derivado caurânico ácido 15 β -isobutirilóxi-caur-16-en-19-óico (**36**) de extratos hexânicos de *M. glomerata*, além de **33** e **2**.

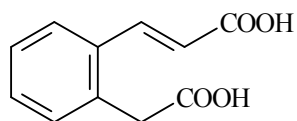
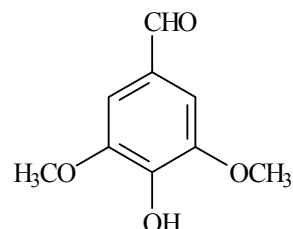


O fracionamento do extrato hexânico de *M. glomerata* realizado por Veneziani e Oliveira (1999) levou à identificação de 11 fitoconstituintes, dentre esses o triterpeno friedelina (**37**), e os esteróides **34** e β -sitosterol (**38**), além dos diterpenos caurênicos **2**, **3**, e os ácidos benzoilgrandiflórico (ácido *ent*-15-benzoiloxi-caur-16(17)-en-19-óico) (**39**) e 17-hidróxi-*ent*-caur-15(16)-en-19-óico (**40**), bem como o diterpeno beierano ácido *ent*-beier-

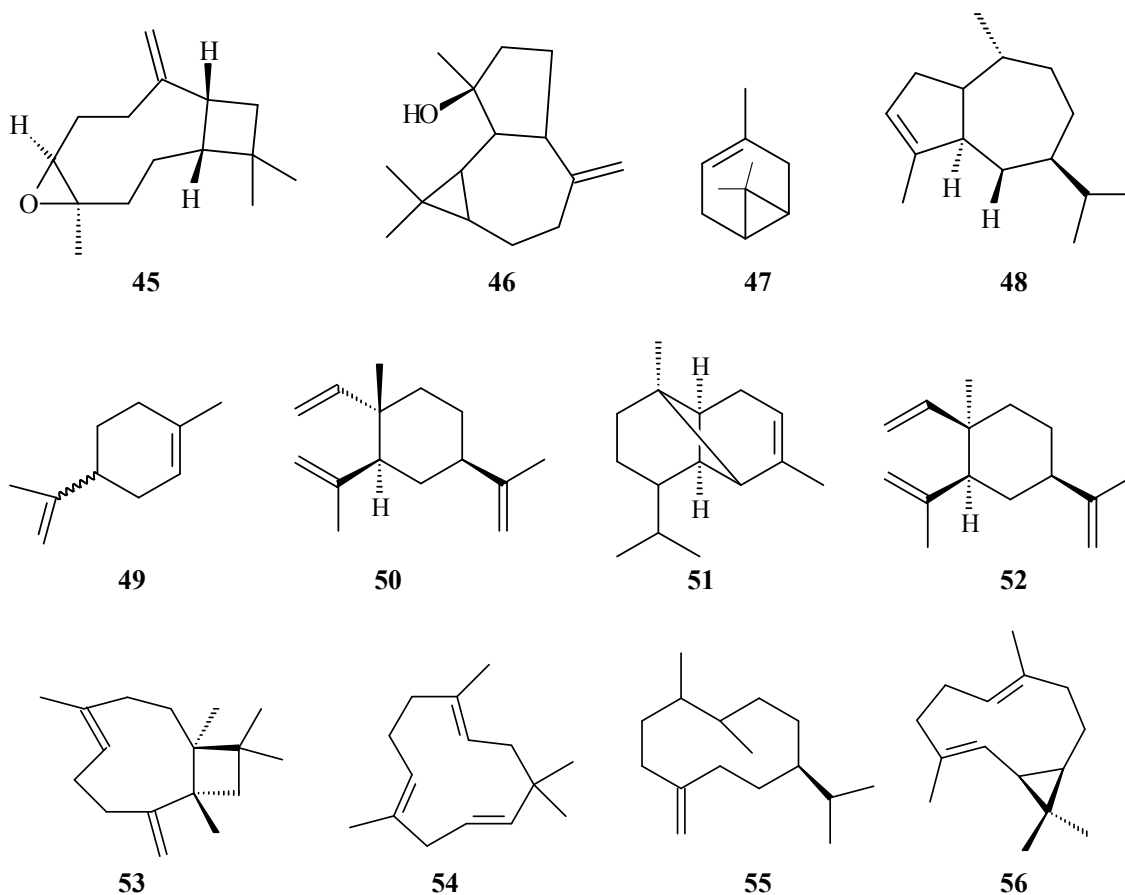
15(16)-en-19-óico (**41**). Os derivados do ácido cinâmico **33** e ácido *o*-hidroxicinâmico (ácido *o*-cumárico) (**42**) também foram isolados (VENEZIANI; OLIVEIRA,1999).

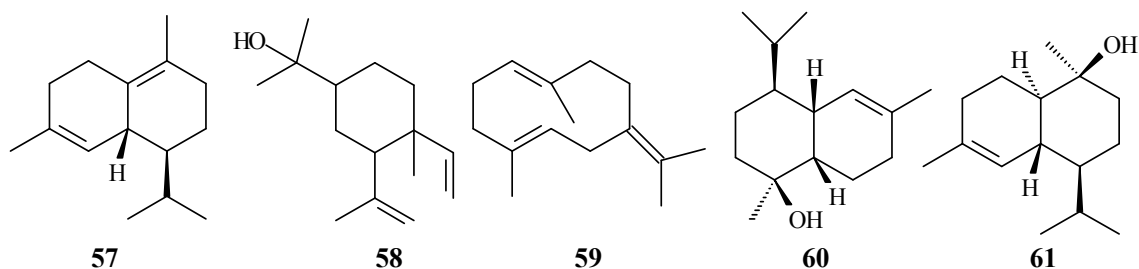
**37****38****39****40****41****42**

Da fração clorofórmica do extrato etanólico a 70% de folhas de *M. glomerata* foram isolados o ácido 2-*trans*-cinamoil-2-acético (**43**) e siringaldeído (**44**) (FRANCHI *et al.* , 2000)

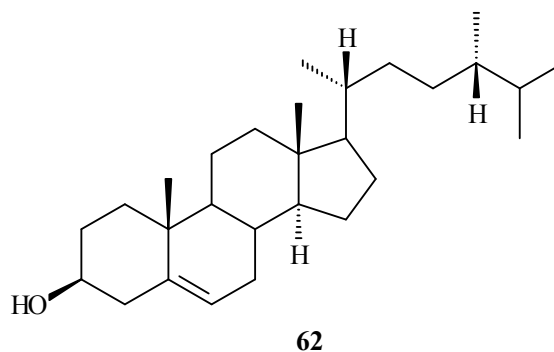
**43****44**

Estudos realizados com óleos essenciais de *M. glomerata* indicaram uma composição complexa, com a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos hidrocarbonados e oxigenados, incluindo óxido de cariofileno (**45**), espatulenol (**46**) e α -pineno (**47**), além de **33** (BRENZAN; FRANCO, 2007). Rehder *et al.* (2000a) identificaram o β -cubebeno (**48**) como principal constituinte dos óleos essenciais obtidos por arraste a vapor de folhas frescas de *M. glomerata* e *M. laevigata*, cultivadas em pleno sol. Duarte *et al.* (2005) relataram, no óleo volátil de *M. glomerata* por CG-EM, a presença de DL-limoneno (0,47%) (**49**), α -elemeno (2,24%) (**50**), α -copaeno (0,88%) (**51**), β -elemeno (0,795) (**52**), *trans*-cariofileno (14,53%) (**53**), α -humuleno (1,87%) (**54**), germacreno-D (41,45%) (**55**), biciclogermacreno (9,81%) (**56**), δ -cadineno (1,42%) (**57**), elemol (1,97%) (**58**), germacreno-B (4,14%) (**59**), espatulenol (2,97%) (**46**), óxido de cariofileno (3,48%) (**45**), *epi*- α -muurolol (2,06%) (**60**) e δ -cadinol (3,03%) (**61**).





Do extrato diclorometânico de calos obtidos a partir de segmentos foliares de *M. glomerata* isolou-se **33** e os esteróides campesterol (**62**), **34** e **38**, não tendo sido isolado nenhum diterpeno do tipo caurano (SANTOS *et al.*, 1999). Esses resultados assemelham-se aos descritos por Taleb-Contini *et al.* (2006), que identificaram por análise de CG dos extratos diclorometânicos de folhas de *M. glomerata*, a presença de **33** e dos diterpenos caurênicos **2**, **3** e **40** em planta propagada por estaca, enquanto no material micropropagado acumulou apenas cumarina (**33**).



3.4 CONTROLE DE QUALIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS

Recentemente, um número cada vez maior de métodos analíticos têm sido publicados para o controle de qualidade de matérias-primas vegetais e fitoterápicos, principalmente pelo emprego de métodos cromatográficos qualitativos e que empregam quantificação simultânea de marcadores químicos (ZHAO *et al.*, 2005; YAN *et al.* 2005; XIE *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2008).

Na China, regulamentações do Departamento de Saúde determinam que para o controle de qualidade de preparações da Medicina Tradicional Chinesa é necessária a

quantificação de no mínimo dois marcadores químicos para cada droga vegetal componente da formulação (SHI *et al.*, 2005).

No Brasil, a ANVISA regulamenta a validação de métodos analíticos através da RE nº 899, cujas análises são requeridas pelas autoridades de saúde brasileiras para o registro de produtos fitoterápicos (BRASIL, 2003; BRASIL, 2004). Apesar das exigências, a existência de protocolos analíticos validados com espécies medicinais brasileiras é incipiente. São poucos os exemplos que podem ser citados, dentre eles aponta-se *Xylopiya frutescens* Aubl (MELO *et al.*, 2001), *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (SOARES *et al.*, 2004), *Ilex paraguariensis* St. Hilaire (GNOATTO *et al.*, 2005), *Cecropia glaziovii* Snethl (LUENGAS-CAICEDO, 2005) e *M. glomerata* e *M. laevigata* para determinação simultânea de cumarina e ácido *o*-cumárico (SANTOS *et al.* 2006).

A determinação quantitativa por CLAE-UV para os marcadores químicos catequina e epicatequina em extratos aquosos de *Maytenus ilicifolia* foi recentemente validada. Essa planta, conhecida popularmente, como espinheira-santa, possui eficácia e segurança confirmadas, por estudos clínicos e farmacológicos, para o tratamento de úlcera gástrica, e é comercializada em diversas formulações industriais (SOARES *et al.*, 2004).

Gnoatto *et al.* (2005) validaram um método analítico por CLAE-UV para a quantificação de saponinas triterpênicas em *Ilex paraguariensis*, uma espécie, cujos ramos e folhas são utilizados para preparo do chimarrão, chá muito consumido em alguns países da América do Sul. Esses autores sugerem a possibilidade do uso de um método similar para análises de saponinas triterpênicas em outras plantas.

Um método isocrático de eluição foi desenvolvido e validado para a determinação quantitativa de derivados caurânicos em *Xylopiya frutescens* por CLAE-UV. Essa espécie, nativa da Amazônia é uma fonte promissora de ácido caurenóico, diterpeno que apresenta atividade *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi* (MELO *et al.*, 2001).

E por último, um método de quantificação simultânea por CLAE-DAD de ácido *o*-cumárico e cumarina em extratos hidroalcoólicos de *M. glomerata* e *M. laevigata* foi desenvolvido e validado por Santos *et al.* (2006). Mais detalhes sobre esse último método constam da Tabela 1, item 3.5.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *M. laevigata* E *M. glomerata*

Diversas técnicas cromatográficas quantitativas estão descritas para *M. glomerata* e *M. laevigata*, focalizando principalmente a determinação da cumarina (CELEGHINI *et al.*, 1999; CABRAL *et al.*, 2001; CELEGHINI *et al.*, 2001; BIAVATTI *et al.*, 2004; DUTRA, 2005; F.BRAS. IV, 2005).

Para as determinações quantitativas de cumarina (**33**) em *M. glomerata* e *M. laevigata* as amostras foram extraídas com etanol a 50% (CELEGHINI *et al.*, 1999; CELEGHINI *et al.*, 2001; DUTRA, 2005; F.BRAS. IV, 2005). A extração conjunta de **33** e ácido caurenóico (**2**) foi relatada em apenas alguns estudos utilizando fluido supercrítico, com *n*-hexano como solvente extrator, como o método mais eficiente (VILEGAS *et al.*, 1997a; VILEGAS *et al.*, 1997b). Nos mesmos estudos, maceração com *n*-hexano por 7 dias ou sonicação com o mesmo solvente também se mostraram eficazes na extração simultânea de **2** e **33**.

A extração por fluido supercrítico é um método que, apesar de seu grande potencial, possui limitações tais como o alto custo instrumental e o elevado número de parâmetros necessários para o controle e otimização da extração (LANÇAS *et al.*, 1997; PINTO *et al.*, 2006). A extração por sonicação apresenta, como vantagens, simplicidade de execução, rapidez, realização em condições brandas e a facilidade de implementação em laboratórios para análises de rotina.

CLAE-UV ou CLAE-DAD são técnicas analíticas amplamente empregadas para quantificar cumarina na droga vegetal e extratos de guaco (CELEGHINI *et al.*, 1999; ABOY *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2000; CELEGHINI *et al.*, 2001; CABRAL *et al.*, 2001; BIAVATTI *et al.*, 2004; DUTRA, 2005; F.Bras.IV, 2005). Eluição isocrática com misturas de acetonitrila:água ou metanol:água, em diversas proporções, e temperatura do forno de 30 °C, foram descritas em vários programas de eluição para a determinação de cumarina nessas espécies (CELEGHINI *et al.*, 1999; ABOY *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2000; CELEGHINI *et al.*, 2001; CABRAL *et al.*, 2001; BIAVATTI *et al.*, 2004; DUTRA, 2005; F.Bras.IV, 2005). Apenas um método desenvolvido e validado para a quantificação de cumarina (**33**) em extrato fluido e tintura de *M. glomerata* utiliza a espectrofotometria derivada de primeira ordem (OSÓRIO; MARTINS, 2004).

A quantificação simultânea de constituintes químicos de *Mikania* foi relatada em alguns estudos (VILEGAS *et al.*, 1997a; VILEGAS *et al.*, 1997b; SANTOS *et al.*, 2006). Ácido caurenóico (**2**) e cumarina (**33**) foram quantificados em *M. glomerata* por cromatografia gasosa (VILEGAS *et al.*, 1997a; VILEGAS *et al.*, 1997b) e por CLAE em extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata*, empregando eluição isocrática de acetonitrila:água (20:80 v/v), contendo 0,01% de ácido acético, fluxo da fase móvel de 1,2 mL, temperatura de 30°C e detecção em 275 nm (SANTOS *et al.*, 2006).

A descrição de diversas condições extrativas e cromatográficas empregadas nos métodos de quantificação de constituintes químicos em folhas de *M. glomerata* e *M. laevigata*, encontradas na revisão bibliográfica realizada estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições extrativas e cromatográficas relacionadas na literatura para o doseamento de marcadores químicos em folhas de *M. glomerata* e *M. laevigata*.

Espécie	Relação droga: solvente	Solvente extrator	Método extrativo	Método de análise	Fase Móvel	Eluição	Fluxo da fase móvel	Coluna	Volume de injeção (µL)	Deteção	Teor dos constituintes	Referência
<i>M. glomerata</i>	1:10	Hexano	Maceração, 7 dias, T°amb	CG	H ₂	-	65 cm/s	Polimetilsiloxano, 25m x 0,53mm, 5 µm, 105 °C a 15°C/min até 200° C e 6°C/min até 240°C	0,4	FID	4,40 ± 0,21 de CO e 2,00 ± 0,06 de KA (mg/g de droga vegetal)	Vilegas <i>et al.</i> , 1997a
<i>M. glomerata</i>	1:10	Hexano	Maceração, 7 dias, T°amb	CG	H ₂	-	65 cm/s	HP-1, 25 m x 0,53mm 5 µm, 105 °C a 15°C/min até 200° C e 6°C/ min até 240°C	0,4	FID/MS	4,40 de CO e 2,00 de KA (mg/g de droga vegetal) 2,4 de CO e 2,47 de KA (mg/g de droga vegetal)	Vilegas <i>et al.</i> 1997b
	1:40	Hexano	Soxhlet, 10 h								0,0 de CO e 2,0 de KA. (mg/g de droga vegetal)	
	0,5 g	CO ₂	SFE, 30 min, 70°C, 10,1 MPa								0,8 de CO e 0,0 de KA (mg/g de material vegetal seco)	
	0,5 g	Hexano (60 mL) + nitrogênio	SFE (20 min, 100°C, 10,1 MPa)								5,1 de CO e 2,3 de ACA (mg/g de droga vegetal)	
<i>M. glomerata</i>	1:10	EtOH:H ₂ O (1:1, v/v)	Maceração c/ sonicção, 20 min, T°amb	CLAE	ACN:água (40:60 v/v)	Isocrática	1 mL/min	Supelco RP-18, 250 mm x 4mm, 5µm, 30 °C	20	UV-DAD (274 nm)	Amostras: 15,23 (min) e 593,78 (máx.) Amostra ref.: 656,15 (µg/mL de CO no extrato)	Celeghini <i>et al.</i> , 1999

Continua...

Espécie	Relação droga: solvente	Solvente	Método extrativo	Método de análise	Fase Móvel	Eluição	Fluxo da fase móvel	Coluna	Volume de injeção (µL)	Deteção	Teor dos constituintes	Referência
<i>M. glomerata</i>	1:10	EtOH:H ₂ O (1:1, v/v)	Maceração c/ sonicção, 20 min, T ^o amb	CLAE	ACN:água (40:60 v/v)	Isocrática	1 mL/min	Supelco RP-18, 250 mm x 4mm, 5µm, 30 °C	20	UV-DAD (274 nm)	Amostras: 15,23 (min) e 593,78 (máx.) Amostra ref.: 656,15 (µg/mL de CO no extrato)	Celeghini <i>et al.</i> , 1999
<i>M. glomerata</i>	1:10	EtOH:H ₂ O (1:1, v/v)	Maceração, 7 dias, T ^o amb	CLAE	ACN:água (40:60 v/v)	Isocrática	1 mL/min	Supelco RP-18, 250 mm x 4mm, 5µm, 30 °C	20	DAD (274 nm)	696,4 ± 34,6 µg/mL de CO no extrato	Celeghini <i>et al.</i> , 2001
		EtOH:H ₂ O (1:1, v/v)	Maceração c/ sonicção, 20 min, T ^o amb								656,2 ± 14,7 µg/mL de CO no extrato	
		Água dest. fervente	Infusão								393,8 ± 13,4 µg/mL de CO no extrato	
<i>M. glomerata</i>	1,5:10	EtOH 50% (v/v)	Refluxo por 30 min, 78 °C,	CLAE	MeOH: água 47:53 (v/v)	Isocrática	0,5 mL/min	Nova Pack C ₁₈ , 150 x 3,9mm, 4µm	20	UV (275 nm)	0,634 mg/mL de CO no extrato	Aboy <i>et al.</i> , 2000
		EtOH 96% (v/v)									0,574 mg/mL de CO no extrato	
		EtOH 50% (v/v)	Percolação								0,780 mg/mL de CO no extrato	
		EtOH 96% (v/v)									0,718 mg/mL de CO no extrato	
<i>M. glomerata</i>	1:100	EtOH:H ₂ O (1:1, v/v)	Refluxo por 30 min sob banho-maria	CLAE	MeOH: água 47:53	Isocrática	0,5 mL/min	ODS, 150 x 3,9 mm, 5 µm	10	UV (275 nm)	---	F.Bras.IV, 2005
<i>M. glomerata</i>	1:10	EtOH:H ₂ O (1:1, v/v)	Sonicção por 20 min	CLAE	ACN:água (40:60 v/v)	Isocrática	1,0 mL/min	Supelcosil LC-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm	20	UV (274 nm)	Dentre diversas análises realizadas, as folhas secas apresentaram teores de 0,71 a 5,20 mg/g de CO	Pereira <i>et al.</i> , 2000

Continua...

Espécie	Relação droga: solvente	Solvente	Método extrativo	Método de análise	Fase Móvel	Eluição	Fluxo da fase móvel	Coluna	Volume de injeção (µL)	Deteção	Teor dos constituintes	Referência
<i>M. glomerata</i> (o mat. veg. teve diferentes origens – Campo Grande (C), Jacarepangua (J) e Petrópolis (P). todas localidades pertencentes ao Estado do RJ)	1:4	Hexano Etanol	Refluxo por 30 min, 3 ciclos, com agitação magnética	CLAE	MeOH: água (50:50)	Isocrática	0,5 mL/min	C ₁₈ Chromosorb, 250 mm x 4mm.	20	UV (220 nm)	0,07% (C) de CO na droga vegetal 0,09% (C); 1,59% (J) e 0,9% (P) de CO na droga vegetal 0,02% (C) de CO na droga vegetal 0,03% (C); 1,35 (J) de CO na droga vegetal	Cabral <i>et al.</i> , 2001
<i>M. laevigata</i>	1:1	EtOH 36% (v/v)	Percolação	CLAE	ACN: água 50:50 (v/v)	Isocrática	0,5 mL/min	Nova Paek C ₁₈ , 150 x 3,9mm, 4µm, 30 °C	20	UV (274 nm)	1,01 mg/mL de CO no extrato	Biavatti <i>et al.</i> , 2004
		EtOH 60% (v/v)									1,58 mg/mL de CO no extrato	
		EtOH 70% (v/v)									1,77 mg/mL de CO no extrato	
	1:10	EtOH 70% (v/v)									0,27 mg/mL de CO no extrato	
	1:1	EtOH 70% (v/v)	Maceração, 50 °C								2,45 mg/mL de CO no extrato	
		EtOH 70% (v/v)	Maceração, 7 dias								1,48 mg/mL de CO no extrato	

Continua...

Espécie	Relação droga: solvente	Solvente	Método extrativo	Método de análise	Fase Móvel	Eluição	Fluxo da fase móvel	Coluna	Volume de injeção (µL)	Deteção	Teor dos constituintes	Referência
<i>M. glomerata</i> (coletada em Paraná)	1:2	Alcool de cereal: água	Percolação exaustiva (método A, F. Bras. I)	CLAE	ACN: água (20:80) (0,01% de ác. acético, pH 3,9)	Isocrática	0,5 mL/min	Nova Pack C ₁₈ , 150 x 3,9mm, 4µm, 30 °C	20	UV (275 nm)	1730 ± 0,01 µg/mL de OC e 1580 ± 0,02 µg/mL de CO no extrato	Santos <i>et al.</i> , 2006
	1:100	Água	Infusão								35,00 ± 1,00 µg/mL de OC e 45,00 ± 2,00 µg/mL de CO no extrato	
<i>M. laevigata</i> (coletada em Paraná)	1:10	Dicloro-metano	Maceração sob sonicação 45 min		MeOH: ACN: água (15:5:80), pH 3,9	Isocrática	1,5 mL/min	Nova Pack C ₁₈ , 150 x 3,9mm, 4µm, 30 °C	20	UV (195 nm)	KA (não determinado)	
	1:2	Alcool de cereal: água	Percolação exaustiva (método A, F. Bras. I)	CLAE	ACN: água (20:80) (0,01% de ác. acético, pH 3,9)	Isocrática	0,5 mL/min	Nova Pack C ₁₈ , 150 x 3,9mm, 4µm, 30 °C	20	UV (275 nm)	380 ± 0,003 µg/mL de OC e 970 ± 0,005 µg/mL de CO no extrato	
<i>M. laevigata</i> (coletada em Santa Catarina)	1:2	Alcool de cereal: água	Percolação exaustiva (método A, F. Bras. I)	CLAE	ACN: água (20:80) (0,01% de ác. acético, pH 3,9)	Isocrática	0,5 mL/min	Nova Pack C ₁₈ , 150 x 3,9mm, 4µm, 30 °C	20	UV (275 nm)	570 ± 0,01 µg/mL de OC e 840 ± 0,015 µg/mL de CO no extrato	
	1:100	Água	Infusão								33,33 ± 0,57 µg/mL de OC e 20,66 ± 0,57 µg/mL de CO no extrato	
<i>M. glomerata</i>	1:10	EtOH:H ₂ O (1:1, v/v)	Sonicação por 40 min	CLAE	ACN: água (40:60 v/v)	Isocrática	1,0 mL/min	Supelcosil LC-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm	20	UV (274 nm)	Dentre diversas análises realizadas, as folhas secas apresentaram teores de 2,97 a 6,95 mg/g de CO	Castro <i>et al.</i> , 2006

Legenda: CO: cumarina; OC: ácido o-cumárico; KA: ácido caurenóico.

3.6 MANEJO AGRONÔMICO DE PLANTAS MEDICINAIS

Lourenzani *et al.* (2004) visando apontar sob quais condições a exploração econômica de plantas medicinais representa uma ameaça, ou uma oportunidade na geração de renda para agricultores familiares, demonstraram que técnicas de cultivo inadequadas, carência de informações e de estudos científicos agronômicos são ameaças à cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil. Nesse ponto, pesquisas agronômicas direcionadas ao estabelecimento de técnicas de cultivo de plantas medicinais, além de incrementarem o potencial produtivo e contribuir para a preservação das espécies, são capazes de produzir drogas vegetais dentro dos parâmetros de qualidade exigidos pela ANVISA.

Além da base genética, fatores edafoclimáticos influenciam sobremaneira o desenvolvimento de espécies vegetais e a biossíntese de metabólitos secundários (BROWN JÚNIOR, 1988; KSOURI *et al.*, 2008). Fatores ambientais podem favorecer ou inibir o desenvolvimento de plantas e influenciar a composição de princípios ativos, uma vez que afetam diretamente a produção de fitomassa e as vias biossintéticas dos metabólitos secundários (BROWN JÚNIOR, 1988; DIXON; PAIVA, 1995; GONÇALVEZ *et al.*, 2005).

A luz tem um notável efeito no crescimento da planta e na biossíntese desses metabólitos, uma vez que esta é a fonte de energia para os processos fotossintéticos e atua como sinalizador que regula por meio de fotoreceptores o crescimento, a diferenciação e o metabolismo das plantas (AFREEN *et al.*, 2005). A eficiência fotossintética afeta diretamente o crescimento e a adaptabilidade das plantas ao ambiente (TAIZ; ZEIGER, 2004). Em presença da luz, a clorofila é constantemente sintetizada e destruída pelo processo de fotoxidação, sendo sua velocidade de decomposição diretamente proporcional à elevada intensidade luminosa, prejudicando o processo de assimilação de carbono e, em consequência, os processos fisiológicos e biossintéticos relacionados (TAIZ; ZEIGER, 2004; EDREVA, 2005). Diversos estudos têm mostrado a influência da luz sobre a síntese de metabólitos secundários em plantas medicinais (ZAVALA; RAVETA, 2001; CASTRO *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2006; ABREU; MAZZAFERA, 2005; AFREEN *et al.*, 2005).

Devido à influência dos fatores ambientais na atividade fisiológica das plantas, novas tecnologias de produção estão surgindo e inovando a agricultura, visando maximizar os processos produtivos (CORRÊA, 2008; POLYSACK..., 2008). Dentre essas tecnologias, o uso de malhas termo-refletoras é uma opção recentemente empregada no Brasil, pois permite

manejar a diferença de temperatura entre o dia e a noite, possibilitando a formação de diversos microclimas, de acordo com a malha utilizada, protegendo as espécies vegetais da radiação solar excessiva e conservando o calor no interior do ambiente (POLYSACK..., 2008). Por outro lado, o cultivo protegido tradicional, além de exigir estrutura onerosa, proporciona efeito estufa pela cobertura plástica, que é prejudicial em épocas quentes do ano e as telas de sombreamento (sombrites), na maioria das vezes, não proporcionam níveis adequados de luz, afetando o desenvolvimento e a produção (CORRÊA, 2008).

As malhas termo-refletores, comercialmente conhecidas por Aluminet[®], estão sendo utilizadas no cultivo de espécies ornamentais, olerícolas e frutíferas proporcionando resultados significativos na produção de fitomassa (SUÁREZ, 1999; MANGETTI, 2002; MEDINA; MACHADO, 2006). Em plantas medicinais alguns trabalhos têm demonstrado a influência na produção de fitomassa e nos teores de metabólitos secundários sob condições ambientais controladas por induzir alterações fisiológicas e bioquímicas na planta (AFREEN *et al.*, 2005; ABREU; MAZZAFERA, 2005; CHAGAS, 2005; PINTO *et al.*, 2007; CORRÊA, 2008).

Em particular, *M. glomerata* apresentou respostas diferentes frente a variações de intensidade de luz e fotoperíodo em ambientes controlados. Castro *et al.* (2006) avaliaram a influência de quatro níveis de luz (pleno sol, 70%, 50% e 30%), utilizando telas preta de nylon, conhecidas como sombrite e quatro fotoperíodos (8, 12, 16 e 20 h) em plantas jovens (100 dias de idade), cultivadas em vaso, quanto ao teor de cumarina (**33**) nas folhas e caules. O estudo demonstrou que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os teores de **33** nas folhas (0,44-0,60%) e nos caules (0,14-0,29%) nos 4 níveis de luz estudados (CASTRO *et al.*, 2006). No entanto, o período de luz recebido pelas plantas influenciou significativamente o teor de **33** nas folhas, sendo o fotoperíodo de 16 h de luz o que apresentou maior teor desse constituinte (0,62%).

Além do efeito da luz, o metabolismo secundário das plantas é influenciado pelos vários outros fatores que caracterizam o estágio ontogênico. Essa influência tem sido estudada em muitas espécies de plantas medicinais (PEREIRA *et al.*, 2000; WITZELL *et al.* 2003; BRESCIANI *et al.* 2004; TAN *et al.*, 2008). A variação na concentração de ácido caurenóico (**2**), diterpeno bioativo presente nas folhas, flores, caules e raízes de *Wedelia paludosa* D.C. (Asteraceae) foi avaliada por Bresciani *et al.* (2004) nas diferentes estações do ano. Os

resultados indicaram que as concentrações de **2** são maiores nas raízes e nos caules durante o outono, com valores de 6,65 e 4,96 mg/g de biomassa seca, respectivamente.

Estudos realizados por Pereira *et al.* (2000) para a espécie *M. glomerata* mostraram que o teor de cumarina (**33**) nas folhas de plantas com um ano de idade, cultivadas na região de Ribeirão Preto, SP, variou nos diferentes meses do ano. Esses autores observaram que os teores de **33** foram maiores nas colheitas realizadas nos meses de janeiro (0,24%) e julho (0,29%).

Com relação aos parâmetros agrônômicos disponíveis sobre os guacos, destacam-se algumas recomendações. Para a propagação, recomenda-se a estaquia semi-lenhosa, utilizando estacas com um nó na parte apical contendo um par de folhas inteiras (aproximadamente 100 cm²) (LIMA *et al.*, 2003a). O plantio deve ser realizado em covas adubadas com fertilizantes orgânicos (húmus ou esterco de curral), em espaçamento de 2,0 m entre plantas e de 2,5 m entre linhas (FIGUEIRA *et al.*, 1991; PEREIRA *et al.*, 1998). Para o cultivo é necessário tutorar a planta em espaldeiras, realizando amarrações periódicas dos ramos nos arames no sentido anti-horário, já que o guaco é uma planta levógira (LIMA *et al.*, 2003b). A colheita das folhas pode ser realizada no período da tarde, após 16 meses do plantio, sendo possível, em escala de produção, colher duas a quatro vezes por ano, sempre deixando pelo menos 30% dos ramos com folhas na planta, para permitir sua recuperação vegetativa (PEREIRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2003b). Em relação à colheita, folhas de *M. glomerata* coletadas em diferentes posições da planta apresentam diferenças nos teores de cumarina, sendo que àquelas colhidas nas regiões basal (0,30%) e mediana (0,42%) apresentaram teores menores que àquelas colhidas no ápice dos ramos (0,70%) (CASTRO *et al.*, 2006). Esses resultados corroboram os dados relatados por Pereira *et al.* (2000), nos quais folhas de *M. glomerata* com dois anos de idade também apresentaram maiores teores de cumarina nas partes apicais dos ramos (0,44%) e a comparação direta entre folhas jovens e maduras confirmaram a produção de cumarina em tecidos jovens.

3.7 QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas medicinais para a produção de fitoterápicos demanda uma série de estudos necessários para garantir eficácia, segurança, qualidade e estabilidade da matéria-prima vegetal e do produto acabado (FDA, 2004; BRASIL, 2004). Na maioria das vezes, o

efeito terapêutico de uma planta medicinal é resultante do sinergismo de seus constituintes ativos, sendo diretamente influenciado por suas concentrações no material vegetal ou derivados (LI *et al.*, 2007). Porém, o armazenamento de drogas vegetais em condições ambientais pode acarretar alterações qualitativas e quantitativas dos constituintes químicos e, essas alterações, por sua vez, podem resultar em variações na intensidade e/ou natureza da atividade biológica (SONAGLIO, 1991).

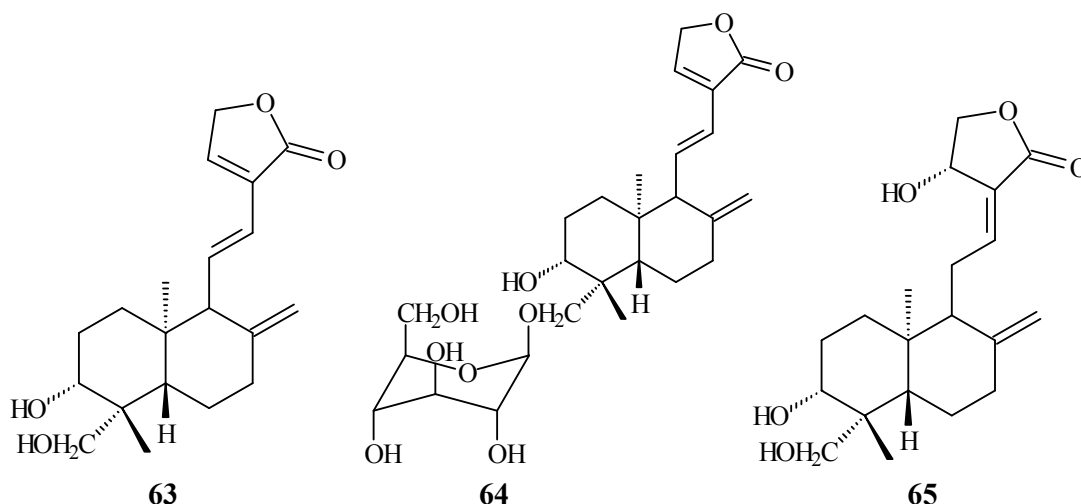
Dessa forma, é fundamental que se estabeleçam métodos seletivos, precisos e reprodutíveis para o controle de qualidade das drogas vegetais, uma vez que a matéria-prima vegetal afeta diretamente a fase inicial do ciclo de processamento tecnológico de fitoterápicos e pode comprometer, consideravelmente, a qualidade do produto acabado (NAKAZAVA, 1999). Dentre os métodos de controle de qualidade disponíveis, análises de perfis cromatográficos (*fingerprints*) têm recebido cada vez mais a atenção da comunidade científica internacional para o controle de qualidade de plantas medicinais e seus derivados devido à sensibilidade do método (DRASAR; MORAVCOVA, 2004). Métodos cromatográficos têm sido empregados não somente na análise da autenticidade de drogas vegetais, mas também na avaliação das condições de crescimento das plantas, sazonalidade da colheita, métodos de processamento e períodos de armazenamento da droga vegetal (DRASAR; MORAVCOVA, 2004).

Yang *et al.* (2005) avaliaram por meio de perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD a estabilidade química de amostras de *Hypericum japonicum* Thumb, estocadas por 1 ano em local frio, seco e ventilado. Não foram observadas alterações nos perfis cromatográficos analisados, e os autores concluíram que essa droga vegetal pode ser estocada por esse período (YANG *et al.*, 2005).

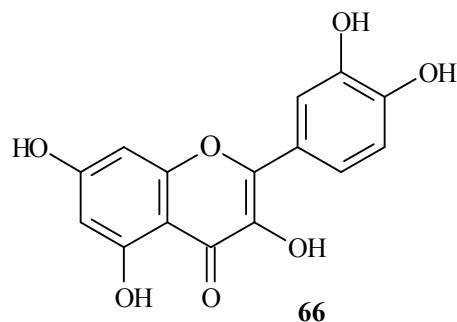
Usando perfis cromatográficos de referência obtidos por CLAE-DAD-EM, juntamente com marcadores químicos, Li *et al.* (2007) avaliaram os efeitos no tempo de armazenamento (1, 2 e 3 anos) de amostras de *Cephalotaxus sinensis* (Rehd et Wile) Li na estabilidade de flavonóides, a qual se manteve estável durante os 3 anos de estocagem.

A estabilidade de três diterpenos presentes em folhas pulverizadas de *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees, mantidas em saco plástico e estocadas à temperatura ambiente por 0, 3, 6, 11, 12 e 15 meses, foi avaliada por Pholphana *et al.* (2004). Esses autores demonstraram que o diterpeno 14-desóxi-11,12-didesidro andrografolideo (**63**) teve sua

concentração aumentada, enquanto o conteúdo de neoandrografolideo (**64**) flutuou durante o período de estocagem e o andrografolideo (**65**) foi o mais estável dos diterpenos.



Alterações na composição química de inflorescências de *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC (marcela) durante a estocagem, foi relatada por Sonaglio *et al.* (1991), utilizando perfis cromatográficos em CCD sobre celulose e cromatografia em papel, com concomitante quantificação de quercetina (**66**) por espectrofotometria no ultravioleta. O material vegetal foi coletado em diferentes regiões do Rio Grande do Sul e submetido a armazenamento em temperatura ambiente, durante 10 e 30 meses. Os resultados indicaram que ocorreram modificações nos perfis cromatográficos de todas as amostras analisadas, caracterizadas por diminuição na intensidade e desaparecimento de picos, além de significativa redução do teor de **66**.



Sabe-se que plantas medicinais sofrem alterações na composição química após a colheita (FENNELL *et al.*, 2004). Este aspecto é de grande relevância para a qualidade de

fitoterápicos e entre as diversas exigências da RDC 48/2004 da ANVISA, consta que se deve garantir a integridade química da droga vegetal (BRASIL, 2004).

De acordo com Fennell *et al.* (2004), poucos estudos têm sido realizados mundialmente para investigar os efeitos de práticas de pós-colheita na composição química de plantas medicinais e, ainda mais reduzido, é o número de estudos relacionados à estocagem e tempo de validade. Grande parte dos estudos de conservação pós-colheita de plantas medicinais e aromáticas focaliza apenas a qualidade sensorial e microbiológica do material armazenado (PÄÄKKÖNEN *et al.*, 1989; PÄÄKKÖNEN *et al.*, 1990; MALMSTEN *et al.*, 1991; SANKAT; MAHARAJ, 1996; SILVA *et al.* 1999; COSTA *et al.*, 1999), embora alguns trabalhos recentes relatam os efeitos da estocagem na atividade biológica das plantas medicinais, associando ou não com análises dos perfis cromatográficos das espécies (GRIGGS *et al.*, 2001; FENNELL *et al.*, 2004; STAFFORD *et al.*, 2005; NAITHANI *et al.*, 2006).

No que se refere às espécies de guaco, existem poucos dados sobre a qualidade pós-colheita das drogas vegetais. Contudo, alguns autores relatam que a secagem das folhas de *M. glomerata* em estufa com circulação forçada de ar a 35-37 °C conserva melhor as características visuais originais da folha, bem como garante um maior teor de cumarina (COSTA *et al.*, 1999; PARENTI *et al.*, 2001). Costa *et al.* (1999) demonstraram que a secagem das folhas de *M. glomerata*, sem prévia lavagem, resulta em maior contaminação microbiológica, mas que não houve diferença entre os tipos de embalagem avaliados na preservação dessa matéria-prima, pois a carga fúngica manteve-se dentro dos padrões aceitáveis. Não foi encontrado, na revisão bibliográfica realizada, nenhum estudo avaliando alterações na composição química de *M. laevigata* e *M. glomerata* durante a estocagem.

Entretanto, há de se considerar o exemplo clássico da conversão de cumarina a dicumarol em folhas fermentadas de *Melilotus* spp, devido ao armazenamento inadequado das folhas e inflorescências secas dessas espécies. O dicumarol apresenta elevada toxicidade, pois interfere no mecanismo de coagulação sanguínea, conduzindo a processos hemorrágicos graves, como foi observado em animais que comeram essa pastagem fermentada (KUSTER; ROCHA, 2003).

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético, Corning, modelo PC-420.
- Aparelho de ponto de fusão, MQAPF-301, Microquímica.
- Balança analítica AB 204, Mettler Toledo, com precisão de 1,0 mg.
- Balança analítica BP 210D, Sartorius, com precisão de 0,01 mg.
- Balança semi-analítica NC 1080, Núcleo, com precisão 1,0 mg.
- Banho de ultra-som, Thornton, modelo 50HT, 40 Hz.
- Banho de ultra-som, Thornton, modelo T14.
- Banho de ultra-som, Unique, modelo USC 1400.
- Banho-maria, Fanem, modelo 120/4.
- Centrífuga, Fanem, modelo 205-N.
- Desumidificador, ARSEC, Modelo RF 610/220V.
- Espectrômetro de infravermelho, Perkin-Elmer FT-IR; modo ATR com referência interna
- Espectrômetros de ressonância magnética nuclear, Bruker Advance DRX200 e DRX400.
- Estufa ventilada, Fanem, modelo 315/9.
- Evaporador rotatório, Buchi, modelo B-480.
- Fonte de luz UV, Spectroline, modelo 977 C.
- Microcentrífuga, Cientec, modelo 14000D.
- Micropipeta, volume ajustável de 100–1000 μL , Eppendorf, modelo 3111000.165,
- Micropipetas, volume ajustável de 20-200 μL e 100-1000 μL , Transferpette-Brand, modelo 704178,
- Moinho de facas, Marconi, modelo MA 680.

- Polarímetro ADP220, Bellingham Stanley Ltd.
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu®, em escala preparativa, bombas mod. LC-8A, detector UV-VIS mod. SPD-6AV e integrador CR-4A.
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Waters® 2695, composto de injetor automático, bomba quaternária L-6200^a com degaseificador de linhas, detector de arranjos de diodos PDA 2996 e sistema computadorizado operado pelo *software* Empower (Waters®).
- Sistema de purificação de água Millipore, Milli-Q_{plus}.
- Soprador serigráfico, Stenel, modelo HL 500.

4.2 SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA E SOLVENTES

- Acetonitrila, grau CLAE, Merck.
- Ácido caféico, Sigma-Aldrich, pureza declarada $\geq 98\%$ (CLAE).
- Ácido caurenóico isolado de *Wedelia paludosa* D.C. (Asteraceae), cedido pelo Dr. Ronan Batista do Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais (DEBI) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).
- Ácido caurenóico isolado de *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae), cedido pela Dra. Jacqueline A. Takahashi do Departamento de Química (ICEX) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).
- Ácido cinâmico, Sigma-Aldrich, pureza declarada $\geq 99\%$.
- Ácido clorogênico, Sigma-Aldrich, pureza declarada $\geq 95\%$ (titulação).
- Ácido ferúlico, Sigma-Aldrich, pureza declarada $\geq 99\%$ (CLAE).
- Ácido *iso*-ferúlico, Sigma-Aldrich, pureza declarada $\geq 97\%$ predominantemente *trans*.
- Ácido *o*-cumárico, Sigma-Aldrich, pureza declarada $\geq 97\%$ (titulação) predominantemente *trans*.
- Ácido ursólico, Sigma-Aldrich, pureza declarada $\geq 90\%$.
- Ácido oleanólico, fonte Sigma-Aldrich, pureza declarada $\geq 97\%$.

- Ácido fosfórico, grau P.A, Merck.
- Ácido acético glacial, grau P.A, Merck.
- Ácido fórmico, grau P.A, Merck.
- Ácido sulfúrico, grau P.A, Merck.
- Ácido fosfórico, grau CLAE, Merck.
- Álcool etílico 96 °GL e absoluto, Quimex.
- β -sitosterol, Sigma-Aldrich, pureza declarada $\geq 90\%$.
- Clorofórmio deuterado, Cambridge Isotope.
- Cumarina, Sigma-Aldrich, pureza declarada $\geq 99\%$ (CLAE).
- Solventes grau P.A Quimex: *n*-hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, éter etílico, metanol, etanol absoluto.
- Metanol, grau CLAE, Merck.

4.3 MATERIAIS DE CONSUMO

- Arame galvanizado
- Bandeja de poliestireno expandido com 128 células, 676 × 340 × 60 mm
- Bicarbonato de sódio, P.A., Quimex.
- Carvão ativo, Synth[®]
- Coluna LiChrospher[®] 100 RP-18 (125 × 4 mm d.i., 5 μ m; Merck.
- Coluna Shim-pack Prep Sil (sílica gel, 250 × 10 mm d.i.), Shimadzu.
- Coluna Shim-pack Prep-ODS (H) (250 × 10 mm d.i.), Shimadzu.
- Colunas cromatográficas de vidro 53 × 102,0 cm, 6,8 cm d.i.; 54 × 105 cm, 23 mm d.i.
- Cromatofolhas de sílica gel 60, 20 × 20 cm, Merck.
- Cromatoplasmas de vidro 10 × 5; 10 × 10 e 10 × 20 cm
- Cubas de vidro, Pirex.

- Adubo orgânico bovino
- Frascos de penicilina com tampa de borracha
- Frascos de vidro com tampa e septos de teflon para CLAE, Merck.
- Frascos de microcentrifugação, Eppendorf.
- Hidróxido de amônio P.A., Quimex.
- Malha termo-refletores Aluminet 40-O, Polysack.
- Malha termo-refletores Aluminet 80-O, Polysack.
- Mourão de eucalipto tratado.
- Papel de filtro qualitativo.
- Pré-coluna LiChrospher[®] 100 RP-18 (4 × 4 mm d.i., 5 µm), Merck[®].
- Pré-coluna ODS 3263, Shimadzu.
- Pré-coluna SIL 3227, Shimadzu.
- Sílica gel 60G, malha 70-230 µm. Merck
- Sílica gel 60G, malha 0,2-0,5 mm e 0,063-0,200 mm, Merck
- Substrato comercial, Plantimax[®]
- Sulfato de sódio anidro P.A., Quimex
- Termohigrômetro, THG 312, Oregon Scientific
- Vials de vidro para CLAE com tampas e septos de silicone e politetrafluoretileno, Merck.
- Vidrarias diversas.

4.4 SOLUÇÕES REVELADORAS EMPREGADAS EM CCD

4.4.1 Reagente de Liebermann-Burchard (WAGNER *et al.*, 1984)

Adicionaram-se 5 mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico a 98% v/v a 50 mL de álcool etílico absoluto, sob resfriamento. A placa é borrifada com a solução e, em seguida revelada sob aquecimento.

4.4.2 Solução de anisaldeído (WAGNER *et al.*, 1984)

Misturaram-se 0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de MeOH e 5 mL de ácido sulfúrico a 98 % v/v, nesta ordem, sob resfriamento. A solução foi armazenada, até o momento de uso, a 4 °C. A placa é borrifada com a solução e, em seguida revelada sob aquecimento.

4.4.3 Solução de NP/PEG (WAGNER *et al.*, 1984)

Para o preparo da solução de NP dissolve-se 0,1g de difenilboriloxietilamina (NP) em 10 mL de MeOH. Essa solução foi armazenada até o momento de uso, à 4°C. A solução de polietilenoglicol é preparada por meio da dissolução de 0,5 g de polietilenoglicol 4000 (PEG) em 10 mL de etanol e armazenada à temperatura ambiente até o momento do uso. Para a revelação borrifa-se a placa com NP e, em seguida, com PEG. Sob luz UV 365 nm ocorre a intensificação da fluorescência de ácidos orgânicos fenólicos e cumarina.

4.4.4 Vapores de amônio (WAGNER *et al.*, 1984)

A placa de CCD foi depositada no interior de uma cuba cromatográfica saturada com vapores de hidróxido de amônio por 10 min. Sob luz UV 365 nm ocorre a intensificação da fluorescência de ácidos orgânicos fenólicos e cumarina.

4.5 IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DAS ESPÉCIES

As espécies vegetais objeto desse estudo foram herborizadas e depositadas em dois herbários distintos. Exsicatas de *M. laevigata* Schultz Bip. ex Baker e *M. glomerata* Sprengel foram depositadas no herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio

Grande do Sul (UFRGS), sob o registro ICN 141990 e ICN 141992, respectivamente. O segundo foi depositado no Herbário SPF do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, coletor Suzan Kelly Vilela Bertolucci, exemplar 1 e 3, sendo respectivamente, classificadas como *M. laevigata* e *M. hatschbachii*. Segundo Ritter e Miotto (2005) *M. hatschbachii* G.M. Barroso é sinônimo de *M. glomerata* Sprengel.

4.6 CULTIVO DAS ESPÉCIES

Os experimentos foram instalados e conduzidos em campo experimental do Setor de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (DAG/UFLA), situado nas coordenadas geográficas 21° 14' S e 45° 00' W, a 918 m de altitude. Segundo a classificação climática de Köppen (1948), o clima regional é do tipo Cwa, com características Cwb, com duas estações definidas: quente e chuvosa, de outubro a março e, amena e seca, de abril a setembro.

As mudas do material vegetal originaram-se de plantas matrizes de *M. glomerata* e *M. laevigata* pertencentes ao Horto Medicinal do DAG/UFLA. Estacas de 15 cm de comprimento, retiradas dos terços médios dos ramos, com um par de folhas, foram cultivadas em bandejas de poliestireno expandido com 128 células, contendo substrato comercial Plantimax[®], em casa de vegetação, com umidade relativa de 75% e temperatura média de 26 ± 2°C. Após a multiplicação das mudas, estas foram transplantadas para o campo experimental.

O plantio das mudas de guaco foi feito em espaçamento de 2 × 2 m, sob tutoramento, sendo realizado sob três níveis de radiação: a pleno sol (0% de interceptação da radiação solar) e sob malhas termo-refletores aluminizados (Aluminet[®]) com 40% e 80% de interceptação da radiação solar. O telado foi revestido na parte superior e nas laterais.

A adubação de plantio foi de 5 litros de adubo orgânico bovino por cova, mantendo-se a adubação anual de 2 litros de esterco por planta. Os tratamentos culturais rotineiros como irrigação, controle de plantas daninhas, pragas e doenças foram realizados ao longo dos ciclos. Na Figura 2 observa-se um croqui da área experimental em cada nível de radiação.

MG	ML	MG
MG	ML	MG
ML	MG	ML
ML	MG	ML

Figura 2. Croqui da área experimental MG: *M. glomerata* e ML: *M. laevigata*.

Os dados climatológicos referentes ao tratamento “pleno sol” foram coletados na Estação Climatológica do Departamento de Engenharia Agrícola da UFLA, situada cerca de 200 m do local experimental, e são referentes às médias estacionais.

4.7 PREPARO DOS EXTRATOS

Após um ano e quatro meses de cultivo, em janeiro de 2005, foram realizadas coletas de folhas de *M. glomerata* e *M. laevigata* cultivadas ao pleno sol para isolamento dos marcadores químicos das espécies. A coleta das folhas foi realizada por amostragem geral dos ramos, tomando-se folhas em todas as partes da planta, ou seja, no ápice, na base e na parte intermediária, obtendo-se uma amostra composta do material vegetal.

As folhas de *M. glomerata* e *M. laevigata* foram secas em sala escura, com desumidificador, a 35 ± 1 °C. O material vegetal foi pulverizado separadamente em moinho de facas e tamisado em peneira de 0,85 mm de malha, sendo, então, submetido à extração por percolação com etanol comercial a 92,8 °INPM. Foram utilizados, respectivamente, 4,0 e 2,0 Kg de pó das folhas de *M. laevigata* e *M. glomerata* para o preparo dos extratos. O solvente extrator foi removido em evaporador rotatório, a 50 °C, sob pressão reduzida, resultando em 564,9 g e 331,6 g de extratos, respectivamente para *M. laevigata* e *M. glomerata*. Porém, a massa obtida para *M. glomerata* foi dividida em 2 porções correspondentes à massa de extrato obtida até 30 dias de percolação (171,2 g) e a obtida após 30 dias de percolação (160,4 g). Esses extratos foram denominados G₁ e G₂, respectivamente, correspondentes ao período anterior e após 30 dias de percolação. Esses extratos não foram reunidos visto que após 30

dias de percolação observou-se o aparecimento de cristais durante a evaporação do solvente extrator.

Os extratos etanólicos secos foram armazenados em frascos de vidro e conservados em freezer a -20°C.

4.8 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS DE *M. laevigata* E *M. glomerata*

Os extratos foram fracionados visando o isolamento dos marcadores químicos das espécies [cumarina (**33**), ácido caurenóico (**2**) e outros constituintes majoritários].

4.8.1 Concentração das frações

As frações recolhidas foram concentradas em evaporador rotatório a 45°C, sob pressão reduzida, e transferidas para frascos previamente tarados. Para a eliminação total do solvente, antes da pesagem, os frascos foram mantidos sob jato de ar frio e, posteriormente, em dessecador sob vácuo por, no mínimo, 48 horas.

4.8.2 Monitoramento do fracionamento cromatográfico

Nos fracionamentos realizados, a composição qualitativa das frações obtidas foi monitorada por CCD de sílica gel, observando-se os cromatogramas sob luz visível e ultravioleta a 365 nm, antes e após a revelação com solução de anisaldeído, Liebermann-Burchard, NP-PEG ou vapores de hidróxido de amônio.

As frações foram reunidas a partir das semelhanças nos perfis cromatográficos, sendo também obtidos perfis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para as frações reunidas e as substâncias isoladas.

4.8.3 Análises qualitativas por CLAE-FR

Foram obtidos perfis cromatográficos por CLAE-FR para os extratos brutos, grupos de frações reunidas e co-injeção com substâncias de referência dos marcadores químicos.

4.8.3.1 Preparo das amostras

As amostras foram pesadas diretamente para frascos plásticos do tipo eppendorf para microcentrifugação e solubilizadas em 1.000 μL de MeOH grau CLAE, na concentração de 10 mg/mL para os extratos, 5 mg/mL para as frações e 1 mg/mL para as substâncias isoladas. As amostras foram solubilizadas com auxílio de sonicação, durante 15 min, seguido de centrifugação a 8.400 g, por 10 min. Empregaram-se os sobrenadantes para análise por CLAE. Foram injetadas alíquotas de 10 μL dos sobrenadantes, de modo automático, no sistema cromatográfico Waters.

4.8.3.2 Condições cromatográficas

Perfis cromatográficos exploratórios foram obtidos para os extratos brutos de *M. laevigata* e *M. glomerata*, frações e substâncias de referência, empregando-se coluna e pré-coluna LiChrospher[®] 100 RP-18 (125 \times 4 mm d.i., 5 μm) e fluxo de 1 mL/min. As análises foram realizadas a 40 °C, com detecção no comprimento de onda de 210 nm. Espectros no UV, na faixa de 205 a 400 nm, foram registrados *on-line* para cada pico. Foi utilizado o gradiente linear descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Gradiente de eluição empregado para registro dos perfis cromatográficos exploratórios por CLAE-FR.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
65	5	95
70	5	95
75	95	5
85	95	5

Legenda: A= água. B = acetonitrila. Ambos os eluentes foram acidificados com 0,1% de ácido fosfórico.

4.8.4 Purificação por CLAE-FN em escala preparativa

As frações contendo diterpenos caurânicos foram purificadas por CLAE-FN em escala preparativa. Para tanto, foi utilizada coluna Shim-pack Prep Sil (sílica gel, 250 \times 10 mm d.i., Shimadzu[®]) e pré-coluna SIL 3227 (Shimadzu[®]), com eluição isocrática de hexano:éter etílico

7:3, fluxo de 5 mL/min, à temperatura ambiente, e detecção no UV em 220 nm. As injeções foram realizadas no modo manual.

Para as injeções foram pesados 30 mg da fração, diretamente em frascos plásticos para microcentrifugação, seguindo-se solubilização em 1 mL de éter etílico destilado. Para completa solubilização das amostras, essas foram submetidas a sonicação por 15 min, seguida de centrifugação a 8.400 g, por 10 min. Os sobrenadantes foram recolhidos e injetados no cromatógrafo.

Para a eluição, empregaram-se solventes com grau de pureza analítico, previamente destilados.

4.8.5 Fracionamento cromatográfico e purificação de constituintes químicos de *Mikania laevigata*

O fluxograma da Figura 3 (pág. 64) representa o fracionamento realizado e substâncias isoladas a partir de *M. laevigata*.

4.8.5.1 Fracionamento do extrato bruto por filtração em sílica gel

Uma porção do extrato etanólico de folhas de *M. laevigata* (500 g) foi submetido à filtração em sílica gel em coluna aberta (malha 0,2-0,5 mm, 582 g, 47,5 × 6,8 cm d.i.). Procedeu-se à filtração a pressão atmosférica, empregando-se a série eluotrópica descrita na Tabela 3. Foram recolhidas frações de 1000 mL. O fracionamento forneceu 209 frações que foram reunidas em 6 grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Fracionamento preliminar do extrato etanólico bruto de *M. laevigata* por filtração em sílica gel.

Fração	Eluente	Grupos	Frações de origem	Massa (g)
1-99	HX	LH ₁ A	1-28	6,76
100-175	DCM	LH ₁ B	29-99	139,54
176-197	EtOAc	LD ₁ A	100-104	35,06
198-209	MeOH	LD ₁ B	105-175	29,02
		LA ₁	176-197	35,26
		LM ₁	198-209	219,54
			Total	465,18

Legenda: HX: *n*-hexano; DCM: diclorometano; EtOAc: acetato de etila; MeOH: metanol.

4.8.5.2 Fracionamento do grupo LD₁A por filtração em sílica gel

O grupo LD₁A (item 4.8.5) apresentou diterpenos caurânicos em sua constituição, segundo análises de CCD e CLAE-FR. Assim, uma porção de 33,0 g dessa fração foi submetida novamente a filtração em sílica gel (malha 0,2-0,5 mm; 159,5 g, 63 × 6,8 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 4, sendo recolhidas frações de 125 mL.

Tabela 4. Fracionamento do grupo LD₁A por filtração em sílica gel.

Fração	Eluente	Grupos	Frações de origem	Massa (g)
1-43	HX:DCM (7:3)	L ₂	1-62	20,82
44-87	DCM	LD ₂	63-87	1,79
88-89	DCM:EtOAc (1:1)	LDA ₂	88-89	4,72
			Total	27,33

Legenda: HX: *n*-hexano; DCM: diclorometano; EtOAc: acetato de etila.

4.8.5.3 Refracionamento do grupo L₂ por CCS

Análise por CLAE-FR, empregando-se substâncias de referência, indicou o grupo L₂ (item 4.8.5.2) com composição abundante em diterpenos caurânicos. Assim, uma porção de 20 g desse grupo foi incorporada a 20 g de sílica gel e submetida à cromatografia em coluna aberta de sílica gel (malha 0,063-0,200 mm, 800 g, 53 × 6,8 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 5, recolhendo-se frações equivalentes a 400 mL.

O grupo L₃F apresentou-se como um sólido branco cristalino (191,10 mg) com forte odor característico de cumarina e o grupo L₃H como um sólido branco amarelado (306,4 mg). Os sólidos obtidos foram analisados por CCD e CLAE-DAD (condição exploratórias item 4.8.3.2) e pela comparação dos tempos de retenção, espectros no UV e co-injeção com substância de referência. O grupo L₃F apresentou grau de pureza satisfatória para sua caracterização por métodos espectrométricos (IV, RMN de ¹³C e ¹H) (item 5.2.1). O grupo L₃H foi submetida a purificação posterior por CCS (item 4.8.5.4).

Análises dos perfis cromatográficos por CCD e CLAE-DAD dos grupos L₃K e L₃N indicaram a presença de diterpenos caurânicos distintos, sendo essas selecionadas para posterior fracionamento.

Tabela 5. Refracionamento cromatográfico do grupo L₂ por CCS.

Fração	Eluente	Grupos	Frações de origem	Massa (mg)
1-22	HX	L ₃	1-22	170,40
23-46	HX:DCM (9:1)	L ₃ A	23-46	80,10
47-64	HX:DCM (8:2)	L ₃ B	47-64	135,00
65-81	HX:DCM (7:3)	L ₃ C	65-81	67,00
82-119	HX:DCM (6:4)	L ₃ D	82-119	161,00
120-172	HX:DCM (1:1)	L ₃ E	120-139	178,40
173-207	HX:DCM (4:6)	L ₃ F	140-151	191,10
208-251	HX:DCM (3:7)	L ₃ G	152-172	684,40
252-297	HX:DCM (2:8)	L ₃ H	173-189	306,40
298-401	HX:DCM (1:9)	L ₃ I	190-207	206,20
402-442	DCM	L ₃ J	208-219	192,10
443-457	DCM:EtOAc (9:1)	L ₃ K	220-285	2.104,10
458-466	DCM:EtOAc (8:2)	L ₃ L	286-297	233,00
		L ₃ M	298-338	1.581,10
		L ₃ N	339-387	268,90
		L ₃ O	388-401	1.566,90
		L ₃ P	402-442	386,80
		L ₃ Q	443-457	4.384,30
		L ₃ R	458-466	762,00
			Total	13.659,20

Legenda: HX: *n*-hexano; DCM: diclorometano; EtOAc: acetato de etila.

4.8.5.4 Purificação do grupo L₃H por CCS

Uma porção de 210 mg do grupo L₃H (item 4.8.5.3) foi incorporada a 240 mg de sílica e depositada no topo de uma coluna aberta de sílica gel (malha 0,063-0,200 mm, 25 g, 34 × 1,0 cm). Procedeu-se à eluição com a série eluotrópica descrita na Tabela 6, recolhendo-se frações de 40 mL.

Tabela 6. Refracionamento do grupo L₃H por CCS.

Fração	Eluente	Grupos	Frações de origem	Massa (mg)
1-26	HX	E ₁	1-26	13,7
27-39	HX:DCM (95:5)	E ₂	27-39	17,1
40-54	HX:DCM (90:10)	E ₃	40-54	11,0
55-75	HX:DCM (85:15)	E ₄	55-75	16,2
76-81	HX:DCM (80:20)	E ₅	76-118	30,8
82-91	HX:DCM (75:25)	E ₆	119-123	54,2
92-103	HX:DCM (70:30)	E ₇	124-133	60,2
104-109	HX:DCM (65:35)		Total	203,2
110-116	HX:DCM (50:50)			
117-133	HX:DCM (40:60)			

Legenda: HX: *n*-hexano; DCM: diclorometano.

A fração E₆ apresentou-se como um sólido opaco de cor branca (54,2 mg) e foi submetida à análise estrutural por métodos espectrométricos (IV, RMN de ¹³C e ¹H).

4.8.5.5 Refracionamento do grupo L₃K por CCS

Uma porção de 2 g do grupo L₃K (item 4.8.5.3) foi incorporada a 1,5 g de sílica e depositada no topo de uma coluna aberta de sílica gel (malha 0,063-0,200 mm, 135 g, 54 × 0,23 cm). Procedeu-se à eluição empregando-se a série eluotrópica descrita na Tabela 7, sendo recolhidas frações de 125 mL.

Análises por CCD e CLAE-FR, empregando-se ácido caurenóico de referência, indicou a presença desse marcador no grupo L₄F.

L₄H apresentou-se como um sólido cristalino branco (404,7 mg).

Tabela 7. Refracionamento do grupo L₃K por CCS.

Fração	Eluente	Grupos	Frações de origem	Massa (mg)
1-16	HX	L ₄	1-15	35,90
17-52	HX:DCM (9:1)	L ₄ A	17-52	15,90
53-87	HX:DCM (8:2)	L ₄ B	53-87	19,40
88-120	HX:DCM (7:3)	L ₄ C	88-120	30,20
121-135	HX:DCM (6:4)	L ₄ D	121-135	45,10
136-150	HX:DCM (5:5)	L ₄ E	136-150	33,50
151-259	HX:DCM (4:6)	L ₄ F	151-175	499,70
260-381	HX:DCM (3:7)	L ₄ G	176-180	164,70
382-432	HX:DCM (2:8)	L ₄ H	181-232	404,70
433-508	HX:DCM (5:5)	L ₄ I	233-259	40,10
509-575	DCM	L ₄ J	260-381	175,50
575-641	DCM:EtOAc (9:1)	L ₄ K	382-432	63,00
642-696	DCM:EtOAc (8:2)	L ₄ L	433-508	74,20
		L ₄ M	509-575	53,40
		L ₄ N	575-641	52,30
		L ₄ O	642-696	30,50
			Total	1.738,10

Legenda: HX: *n*-hexano; DCM: diclorometano; EtOAc: acetato de etila.

4.8.5.6 Purificação do grupo L₃N por CCS

Uma porção de 260 mg do grupo L₃N (item 4.8.5.3) foi incorporada a 710 mg de sílica e depositada no topo de uma coluna aberta de sílica gel (malha 0,063-0,200 mm, 34 g, 32 × 2,0 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 8, sendo recolhidas frações de 40 mL. O grupo LC₃ originou um sólido cristalino branco (96,6 mg).

Tabela 8. Purificação do grupo L₃N por CCS.

Fração	Eluente	Grupos	Frações de origem	Massa (mg)
1-67	HX	LC ₁	1-67	53,4
68-92	HX:Et ₂ O (95:5)	LC ₂	68-86	47,1
93-105	HX:Et ₂ O (90:10)	LC ₃	87-89	96,6
		LC ₄	90-105	25,2
			Total	222,3

Legenda: HX: *n*-hexano; Et₂O: éter etílico.

4.8.5.7 Purificação do grupo L₄F por CLAE-FN em escala preparativa

O perfil cromatográfico por CLAE-DAD do grupo L₄F (item 4.8.5.5) indicou a presença de picos com tempos de retenção distintos, compatíveis com diterpenos caurânicos e, esta foi então, selecionada para purificação em sistema de CLAE-FN em escala preparativa, cujas condições cromatográficas estão descritas no item 4.8.4. Foram injetados 360 mg de L₄F, resultando em 7,8 mg de um sólido branco amorfo, denominado LC.

Folhas secas de *M. laevigata* (500 g)

1. Percolação com etanol comercial
2. Remoção do solvente
3. Remoção de uma alíquota do extrato etanólico (64,9 g)

Extrato etanólico (500 g)

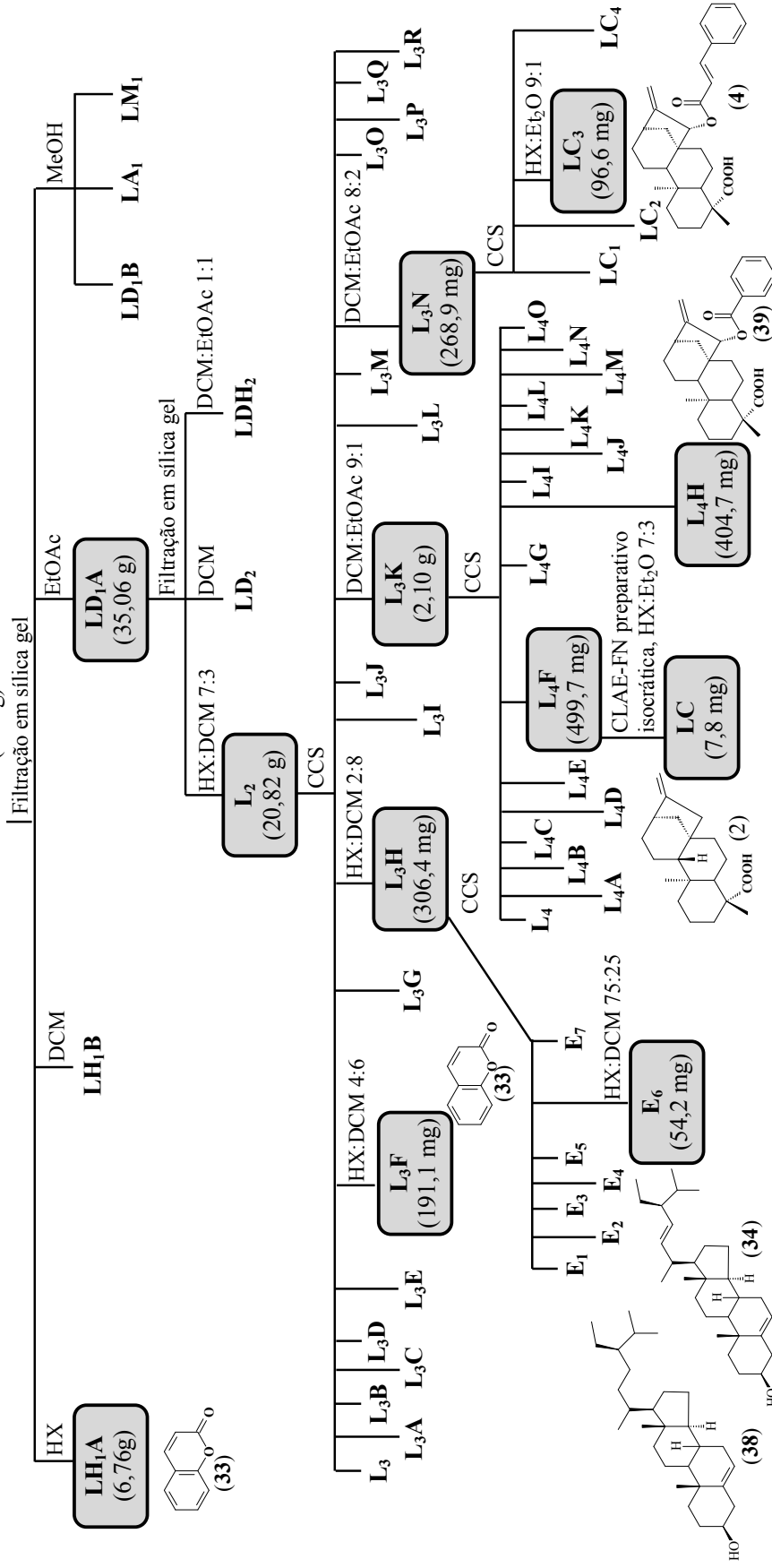


Figura 3. Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico de *M. laevigata*.

4.8.6 Fracionamento cromatográfico e purificação de constituintes químicos de *Mikania glomerata*

A sequência do fracionamento cromatográfico e isolamento de marcadores químicos dos extratos etanólicos G₁ e G₂ de *M. glomerata* (item 4.7) pode ser acompanhada pelo fluxograma da Figura 4 (pág. 68).

4.8.6.1 Fracionamento de G₁

Objetivando isolar derivados do ácido cinâmico e ácidos diterpênicos presentes no extrato G₁ de *M. glomerata*, submeteu-se este extrato à extração com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio para separação dos ácidos carboxílicos. Para tanto, um total de 170 g do extrato foi dividido em cinco porções de 30 g e uma de 20 g. Cada porção foi solubilizada em 150 mL de acetato de etila, sob sonicação, por 15 min. Posteriormente, a fração solúvel foi extraída com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (3 × 100 mL). Na sequência, as frações orgânicas, oriundas dessas extrações, foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório, a 50 °C, sob pressão reduzida, resultando em 103,2 g de resíduo seco, sendo essa fração denominada G_{1A}. Análises dessa fração por CCD de sílica gel e CLAE-FR, empregando diterpenos caurânicos de referência, indicaram presença desses constituintes.

A fração aquosa alcalina foi acidificada até pH 2, com HCl concentrado e extraída com EtOAc (3 × 100 mL). As frações orgânicas obtidas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas em evaporador rotatório, a 50 °C. Para a eliminação total do solvente, antes da pesagem, os frascos foram mantidos sob jato de ar frio e, posteriormente, em dessecador sob vácuo por, no mínimo, 48 h. Essa fração resultou em um resíduo de 10,68 g, denominado G_{1B}. Análises por CCD de sílica gel utilizando o sistema de eluição éter:tolueno 1:1 acidificado (Wagner, 1984) e análise exploratória por CLAE-FR (item 4.8.3.3) foram realizadas para G_{1B}, e seus perfis cromatográficos comparados com tempos de retenção, espectros no UV e co-injeção com ácido cinâmico de referência e seus derivados (ácidos clorogênico, ferúlico, *iso*-ferúlico, *p*-cumárico, *o*-cumárico e caféico).

4.8.6.2 Purificação de G_{1A} (fração enriquecida em diterpenos caurânicos)

Uma porção de 100 g de G_{1A} foi solubilizada em 4000 mL de etanol a 96 °GL. O volume total de extrato obtido foi dividido em alíquotas de 250 mL, sendo essas tratadas com carvão ativo, sob agitação magnética, por 2 min, para adsorção de clorofilas. No total, foram consumidos 263 g de carvão ativo. A remoção de clorofilas foi monitorada pela inspeção visual da coloração do extrato, que passou de verde escuro para amarelo ouro e, também, por CCD, quando manchas vermelhas visualizadas sob luz UV_{365nm} , características de clorofila, não foram mais observadas.

As alíquotas do extrato tratado com carvão ativo foram reunidas e secas em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Seguiu-se a análise por CCD de sílica gel do resíduo obtido, denominado GC_{1A} , utilizando-se como substância de referência o ácido caurenóico. As placas mostraram a presença de uma mancha com fator de retenção similar a esse diterpeno, após revelação com anisaldeído, também confirmada por análises de CLAE-FR.

Para a purificação de GC_{1A} utilizou-se CLAE-FN em escala preparativa, cujas condições estão descritas no item 4.8.4. Foram injetados 300 mg de GC_{1A} , resultando em 34,8 mg de um sólido amorfo incolor denominado GC.

4.8.6.3 Fracionamento cromatográfico de G_{1B} por CCS

Uma porção de 10,0 g da fração G_{1B} , resultante da extração do extrato G_1 de *M. glomerata* (item 4.6.6.1) com bicabornato de sódio, foi incorporada a 7,93 g de sílica gel e depositada no topo de uma coluna aberta de sílica gel (malha 0,063-0,200 mm, 500 g; 55 × 5,0 cm). Empregou-se como série eluotrópica misturas de solventes descritas na Tabela 9. Foram coletadas frações de 200 mL.

Tabela 9. Fracionamento de G_{1B} em CCS.

Fração	Eluente	Grupos	Frações de origem	Massa (mg)
1-61	DCM:EtOAc (6:4)	CIN1	1-7	518,3
62-93	DCM:EtOAc (7:3)	CIN2	8-10	664,9
94-111	DCM:EtOAc (8:2)	CIN3	11-16	679,5
112-147	DCM:EtOAc (9:1)	CIN4	17-21	197,5
148-179	EtOAc	CIN5	22-54	576,9
180-194	EtOAc:MeOH (9:1)	CIN6	55-93	461,4
		CIN7	94-111	115,9
		CIN8	112-147	161,4
		CIN9	148-179	154,4
		CIN10	180-194	491,5
			Total	4.021,7

Legenda: DCM: diclorometano; EtOAc: acetato de etila; MeOH: metanol.

4.8.6.4 Fracionamento cromatográfico por CLAE-FR em escala preparativa do grupo CIN4 e do extrato G₂ de *M. glomerata*

O grupo CIN4 (item 4.8.6.3) e o extrato G₂ foram submetidos a fracionamento por CLAE-FR em escala preparativa, utilizando-se coluna Shim-pack Prep-ODS (H) (250 × 10 mm d.i.) e pré-coluna ODS 3263 (Shimadzu®). Vários sistemas de eluição preparados pela mistura de (A) água acidificada com 0,1% de ácido fosfórico e (B) MeOH (25, 30, 40, 44, 46 e 48% de B) foram avaliados, empregando fluxo de 5 mL/min, à temperatura ambiente e detecção no UV_{220nm}.

As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.8.4, porém solubilizadas em MeOH. Foram realizadas 5 injeções da fração CIN4 e 10 injeções do extrato G₂, empregando-se massa de 10-30 mg/mL por injeção.

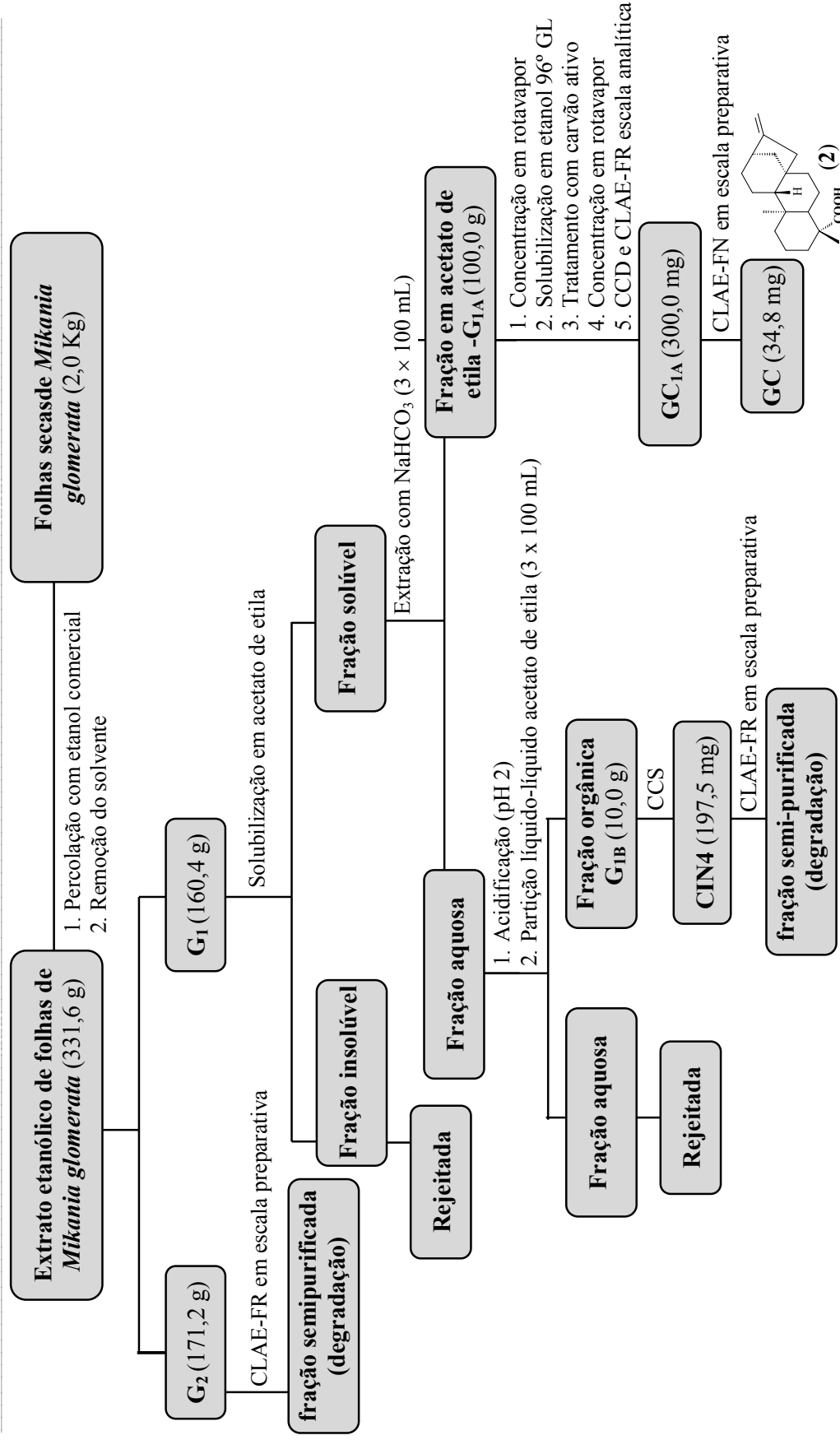


Figura 4. Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico de *M. glomerata*.

4.8.7 Pureza, caracterização físico-química e estrutural das substâncias isoladas

A pureza das substâncias isoladas foi avaliada a partir dos perfis em CCD, CLAE-DAD e pela determinação das faixas de fusão.

As substâncias foram caracterizadas estruturalmente por espectrometrias de RMN de ^1H e de ^{13}C e por absorção molecular no infravermelho. Os espectros de RMN foram obtidos no Departamento de Química, ICEX, UFMG, a temperatura de 25 °C, utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna para ambos os núcleos. Clorofórmio deuterado (CDCl_3) foi utilizado como solvente. Os espectros de absorção molecular no infravermelho foram obtidos no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia, UFMG, à temperatura de 25 °C. Os espectros foram adquiridos diretamente, pelo modo de reflectância atenuada, sem emprego de diluição em brometo de potássio (KBr).

A atividade ótica ($[\alpha]_D$) dos derivados diterpênicos foi determinada no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia, UFMG, no comprimento de onda de 589 nm, a 24 °C, usando caminho ótico de 5 mm. As amostras foram solubilizadas em MeOH, na concentração de 2 mg/mL.

4.9 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS EM *M. laevigata* E *M. glomerata* POR CLAE-FR

4.9.1 Sistema cromatográfico

O desenvolvimento e validação do método foram realizados em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Waters 2695. As análises foram realizadas em coluna LiChrospher® 100 RP-18 (125 × 4 mm i.d., 5 µm; Merck), em combinação com pré-coluna LiChrospher® 100 RP-18 (4 × 4 mm i.d., 5 µm; Merck).

4.9.2 Material vegetal

O material vegetal empregado no desenvolvimento e validação do método cromatográfico para quantificação de marcadores químicos em *M. glomerata* e *M. laevigata* foi coletado, em maio de 2006, de plantas ($n = 6$ indivíduos por espécie) com 32 meses de

idade, cultivadas a pleno sol (item 4.6). A coleta das folhas foi feita por uma amostragem geral dos ramos, tomando-se folhas em todas as partes da planta, ou seja, no ápice, na base e na parte intermediária. O material coletado foi reunido para obter uma amostra composta de cada espécie.

Para as análises as folhas foram secas em estufa com ventilação forçada de ar a 40 °C, até peso constante. O material vegetal seco foi pulverizado em moinho de facas e mantido em freezer a -20 °C até as análises.

4.9.3 Desenvolvimento do método analítico

4.9.3.1 Preparo das amostras

Para as análises, 1 g de folhas secas foi extraída com 3 × 30 mL de CH₂Cl₂/EtOH 1/1 (v/v) em banho de ultra-som, por 20 min. O solvente foi evaporado sob vácuo em evaporador rotatório, à temperatura máxima de 40 °C, e os resíduos foram dissolvidos em 1.000 µL de MeOH a uma concentração final de 10 mg/mL. Extratos fortificados de *M. laevigata* foram preparados adicionando ácido *o*-cumárico a uma concentração final de 0,1 mg/mL, enquanto ácido *o*-cumárico e cumarina foram adicionados nos extratos de *M. glomerata*, na concentração final de 0,1 mg/mL para cada marcador. Após sonicação por 15 min, as soluções foram centrifugadas a 8.400 g e alíquotas de 10 µL dos sobrenadantes foram injetadas automaticamente no cromatógrafo.

4.9.3.2 Preparo das soluções de referência

As substâncias de referência (cumarina e ácidos *o*-cumárico, benzoilgrandiflórico, cinamoilgrandiflórico e caurenóico) foram pesadas separadamente, diretamente para frascos de microcentrifugação, seguindo-se solubilização em 1.000 µL de MeOH grau CLAE, na concentração de 1,0 mg/mL. Essas amostras foram então submetidas à sonicação durante 15 min, e em seguida centrifugadas a 8.400 g, por 10 min. Mistura equivolúmica das soluções de referência também foi preparada. Foram injetadas alíquotas de 10 µL das soluções de substâncias isoladas e em mistura, automaticamente no sistema cromatográfico.

4.9.3.3 Desenvolvimento da condição cromatográfica

O desenvolvimento e otimização da condição cromatográfica compreendeu a avaliação de parâmetros relacionados com a resolução dos picos de interesse, incluindo o modificador orgânico, temperatura, fluxo, modo de eluição (isocrático e gradiente linear) e inclinação do gradiente. As condições avaliadas estão sumariadas na Tabela 10. A identificação dos picos correspondentes aos marcadores químicos nos cromatogramas, em cada condição cromatográfica, foi feita a partir dos perfis espectrais no ultravioleta a 210 nm e pela co-injeção com substâncias de referência. Espectros no UV, na faixa de 205 a 400 nm, foram registrados *on-line* para cada pico.

A seletividade do método foi avaliada pela homogeneidade espectral dos picos, no comprimento de onda específico para cada marcador (210, 230 e 270 nm). Essa análise foi realizada pela sobreposição dos espectros registrados nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos, sendo considerados puros quando apresentaram exata sobreposição. O método foi considerado seletivo quando os cinco marcadores químicos apresentaram pureza dos picos, simultaneamente, em uma mesma condição cromatográfica.

A eficiência da condição cromatográfica estabelecida também foi avaliada pela determinação de parâmetros de adequação do sistema (*system suitability test*), compreendendo determinação da resolução, fator de retenção, fator de cauda, número de pratos teóricos e DPR dos tempos de retenção para os picos dos marcadores químicos. Esses parâmetros foram calculados pelo *System Suitability* do programa Empower[®] (Waters), de acordo com as equações recomendadas pela Farmacopéia Americana (USP, 2006), sendo os resultados expressos como valor médio de seis determinações. Os resultados foram comparados com os limites recomendados pelo FDA (2000). Para estabelecer o tempo morto (t_0) da corrida cromatográfica foram injetado no sistema, nas mesmas condições de análise, 10 μ L de solução metanólica de nitrato de sódio 0,01% (p/v).

Tabela 10. Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método por CLAE-FR para análises dos marcadores químicos em folhas de *M. laevigata* e *M. glomerata*.

Tempo (min)	Eluente* (%)			Temp. (°C)	Tempo (min)	Eluente* (%)			Temp. (°C)
	A	B	C			A	B	C	
Condição experimental A					Condição experimental B				
0	95	-	5	40	0	95	5	-	40
65	5	-	95		65	5	95	-	
70	5	-	95		70	5	95	-	
Condição experimental C e D					Condição experimental E				
0	90	-	10	30(C)	0	85	15	-	25
30	10	-	90		30	5	95	-	
40	10	-	90	25(D)	40	5	95	-	
45	90	-	10	45	85	15	-		
Condição experimental F					Condição experimental G				
0	85	15	-	25	0	63	37	-	25
20	32	68	-		15	50	50	-	
21	30		60		17	60	-	40	
30	5		95		25	10	-	90	
40	5		95		35	10	-	90	
45	85	15			40	63	37	-	
Condição experimental H e I**					Condição experimental J				
0	66	34	-	25	0	66	34	-	25
15	50	50	-		15	50	50	-	
17	60	-	40		16	60	-	40	
25	5	-	95		20	35	-	65	
35	5	-	95		35	20	-	80	
40	66	34	-		40	5	-	95	
Condição experimental K					Condição experimental L				
0	66	34	-	25	0	66	34	-	25
15	50	50	-		15	50	50	-	
16	60	-	40		16	60	-	40	
20	35	-	65		20	35	-	65	
40	20	-	80		43	20	-	80	
45	5	-	95		45	5	-	95	
50	5	-	95	50	5	-	95		
55	66	34	-	55	66	34	-		
Condição experimental N (condição estabelecida)					Condição experimental M				
0	66	34	-	25	0	66	34	-	25
15	50	50	-		15	50	50	-	
16	60	-	40		16	60	-	40	
20	35	-	65		20	35	-	65	
38,1	24	-	76		20	35	-	65	
38,1	5	-	95		45	20	-	80	
40	5	-	95		45	20	-	80	
45	66	34	-		55	5	-	95	
55	66	34	-		60	66	34	-	

Legenda: Eluentes: **A**, água; **B**, metanol; **C**, acetonitrila. Todos os eluentes foram acidificados com 0,1% de ácido fosfórico. **Nota:** a eluição foi realizada com fluxo de 1,0 mL/min em todas as condições avaliadas, exceto para a condição I, que foi de 0,9 mL/min. Detecção foi realizada a 210 nm para todos os casos, excluindo a condição K e N, que empregaram detecções a 210, 230 e 270 nm.

4.9.4 Otimização das condições de extração

Visando estabelecer uma condição efetiva para extrair simultaneamente os marcadores químicos (cumarina e ácidos *o*-cumárico, benzoilgrandiflórico, cinamoilgrandiflórico e caurenóico), diferentes procedimentos extrativos foram avaliados para ambas as espécies.

As condições de extração foram avaliadas para folhas pulverizadas de *M. laevigata* e *M. glomerata* (1,0 g), empregando sonicação com diferentes solventes e ciclos de extração (Tabela 11). Após cada ciclo de extração, os extratos foram filtrados a vácuo e analisados separadamente a fim de avaliar a eficiência extrativa do ciclo correspondente. Para as análises, os extratos foram concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, à temperatura máxima de 40 °C. Os extratos obtidos foram solubilizados em 1.000 µL de metanol grau CLAE, na concentração final de 10 mg/mL, submetidos à sonicação em banho de ultra-som por 15 min, centrifugados a 8.400 g por 10 min e alíquotas (10 µL) dos sobrenadantes foram injetadas automaticamente no cromatógrafo.

A eficiência da extração foi avaliada através da integração das áreas dos picos correspondentes aos marcadores químicos. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com oito tratamentos e três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste de F ($p < 0,05$) e as médias dos dados comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 11. Condições de extração avaliadas para *M. laevigata* e *M. glomerata*.

Código	Extração por sonicação		
	Solvente	Tempo (min)	Ciclo × volume (mL)
EtOAc	Acetato de etila	20	3 × 30
DCM	Diclorometano	20	3 × 30
D/E	Diclorometano seguido de Etanol	20	3 × 30 cada
EtOH	Etanol	20	3 × 30
D:E 20	Diclorometano:Etanol 1:1	20	3 × 30
D:E 30	Diclorometano:Etanol 1:1	30	3 × 30
D:E 45	Diclorometano:Etanol 1:1	45	3 × 30
D:E 60	Diclorometano:Etanol 1:1	60	3 x 30

*O etanol empregado nas extrações foi etanol absoluto.

4.9.5 Validação do método analítico

A validação do método cromatográfico desenvolvido (item 4.9.3) foi realizada segundo critérios do guia ICH (*International Conference on Harmonisation*) e da Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ICH, 1996 e Brasil, 2003).

O programa Empower[®] (Waters) foi usado para aquisição e processamento dos dados. As análises estatísticas foram feitas nos programas Microsoft Excel[®] (Microsoft Corporation, 2003) e GraphPad Prism[®], versão 4 (GraphPad Software, 2003).

4.9.5.1 Condição cromatográfica estabelecida

A condição cromatográfica analítica estabelecida para o método está descrita a seguir.

Coluna LiChrospher[®] 100 RP-18 (125 × 4 mm d.i., 5 µm).

Pré-coluna LiChrospher[®] 100 RP-18 (4 x 4 mm d.i., 5 µm).

Temperatura da coluna: 25 °C.

Fase móvel: gradiente de eluição das soluções A, B e C, apresentado na Tabela 12.

Solução A: água Milli-Q acidificada com 0,1% de ácido fosfórico.

Solução B: metanol grau CLAE acidificado com 0,1% de ácido fosfórico.

Solução C: acetonitrila grau CLAE acidificada com 0,1% de ácido fosfórico.

Fluxo: 1,0 mL/min.

Comprimentos de onda de detecção: 210 (derivados cinâmicos e ácido caurenóico), 230 (ácido benzoilgrandiflórico e 270 nm (ácido cinamoilgrandiflórico).

Volume de injeção: 10 µL.

Tabela 12. Programa de eluição estabelecido para a quantificação de marcadores químicos em folhas de *M. glomerata* e *M. laevigata*.

Tempo (min)	%A	%B	%C	Modo de eluição
0	66	34	0	gradiente linear
15	50	50	0	gradiente linear
16	60	0	40	gradiente linear
20	35	0	65	gradiente linear
38	24	0	76	gradiente linear
38,1	5	0	95	isocrático
40	5	0	95	isocrático
45	66	34	0	gradiente linear
55	66	34	0	isocrático

4.9.5.2 Preparo das amostras

Pesou-se, exatamente, cerca de 1,0 g de folhas pulverizadas de guaco que foi submetido à extração com etanol absoluto (2 × 30 mL), à temperatura ambiente, por 20 min. em cada ciclo. Os extratos foram filtrados sob vácuo em papel de filtro e reunidos em balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com etanol. A solução foi homogeneizada e uma alíquota de 10 mL foi transferida para um balão de evaporador rotatório, sendo concentrada até resíduo, sob pressão reduzida, à temperatura máxima de 50 °C. O resíduo obtido foi retomado com 1000 µL de metanol grau CLAE e transferido para frascos plásticos dos tipo Eppendorf, submetidos à solubilização em banho de ultra-som por 15 min e centrifugados a 8.400 g por 10 min. Alíquotas de 10 µL dos sobrenadantes foram injetadas automaticamente no cromatógrafo.

4.9.5.3 Preparo do *pool* de soluções de referência

Soluções de referência dos marcadores químicos (cumarina, ácidos *o*-cumárico, benzoilgrandiflórico, cinamoilgrandiflórico e caurenóico) foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL de cada substância, empregando metanol grau CLAE.

O *pool* das soluções foi preparado tomando-se alíquotas de 200 µL de cada solução de referência, as quais foram misturadas diretamente em *vial* e injetadas no cromatógrafo.

4.9.5.4 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela homogeneidade espectral dos picos, no comprimento de onda específico para cada marcador (210, 230 e 270 nm). Essa análise foi realizada pela sobreposição dos espectros registrados nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos, sendo considerados puros quando apresentaram exata sobreposição.

Para as determinações foram empregadas amostras de *M. laevigata* e *M. glomerata* ($n=6$ para cada espécie).

4.9.5.5 Teste de adequação do sistema

Experimentos de adequação do sistema (*system suitability test*) foram realizados para estabelecer se o sistema cromatográfico e os procedimentos analíticos otimizados seriam capazes de fornecer dados de qualidade aceitável para análises quantitativas. Os parâmetros avaliados foram resolução, fator de retenção, fator de cauda, número de pratos teóricos e DPR dos tempos de retenção dos compostos de interesse. Os dados foram obtidos pelo *System Suitability* do programa Empower[®] (Waters), de acordo com as equações recomendadas pela *United States Pharmacopoeia* (USP) (USP, 2006), sendo os resultados expressos como valor médio de 6 determinações. Os resultados foram comparados com os limites recomendados pelo FDA (2000). Para se estabelecer o tempo morto (t_0) da corrida cromatográfica, injetou-se no sistema, nas mesmas condições de análise, 10 μ L de solução de nitrato de sódio 0,01% (p/v) preparada na fase móvel.

4.9.5.6 Linearidade

A linearidade foi determinada para cada marcador, utilizando-se no mínimo cinco concentrações distintas. Cada ponto das curvas analíticas foi obtido pela injeção, em triplicata, de diferentes alíquotas das soluções de referência (item 4.8.3.1), na faixa de 4 a 32 μ L, como indicados nas Tabelas 13 a 17 (pág. 77 a 80). As curvas analíticas foram determinadas em relação à massa injetada de cada substância de referência, em dois dias consecutivos.

Os dados obtidos para cada substância foram submetido à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação (r^2) correspondentes foram calculados. As curvas obtidas nos dois dias consecutivos foram comparadas estatisticamente por análise de variância ($p < 0,05$).

Estimativas de faixas de concentração de trabalho

Estimativas das faixas de concentração de trabalho dos marcadores químicos foram estabelecidas com base nos percentuais dos marcadores isolados, a partir dos materiais vegetais trabalhados, e de dados de teores relatados na literatura (VILEGAS *et al.*, 1997a; PEREIRA *et al.*, 2000; F.BRAS.IV, 2005).

Preparo das soluções estoque das substâncias de referência

Foram preparadas duas réplicas de cada solução de referência dos marcadores químicos.

Ácido *o*-cumárico

Pesaram-se, precisamente, cerca de 5,0 e 20,0 mg de ácido *o*-cumárico, diretamente para balões volumétricos de 100,0 mL. Dissolveu-se em MeOH grau CLAE e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se soluções nas concentrações finais de 50 e 200 µg/mL, respectivamente. Para a construção das curvas analíticas, essas soluções foram injetadas no sistema cromatográfico conforme indicado na Tabela 13.

Tabela 13. Correspondência entre os volumes e as massas injetadas para construção da curva analítica do ácido *o*-cumárico, conforme a concentração da solução de referência.

Volume (µl)	Massa (µg)
Solução de referência 50,0 µg/mL	
5,0	0,25
10,0	0,50
20,0	1,00
Solução de referência 200,0 µg/mL	
10,0	2,00
20,0	4,00

Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.9.5.1.

Cumarina

Pesaram-se, precisamente, cerca de 10,0 e 25,0 mg de cumarina, diretamente para balões volumétricos de 100,0 mL. Dissolveu-se em MeOH grau CLAE e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se soluções nas concentrações finais de 100 e 250

$\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Para a construção das curvas analíticas, essas soluções foram injetadas no sistema cromatográfico conforme indicado na Tabela 14.

Tabela 14. Correspondência entre os volumes e as massas injetadas para construção da curva analítica da cumarina, conforme a concentração da solução de referência.

Volume (μl)	Massa (μg)
Solução de referência 100,0 $\mu\text{g/mL}$	
5,0	0,5
10,0	1,0
30,0	3,0
Solução de referência 250,0 $\mu\text{g/mL}$	
16,0	4,00
20,0	5,00

Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.9.5.1.

Ácido benzoilgrandiflórico

Pesaram-se, precisamente, cerca de 25,0 mg de ácido benzoilgrandiflórico diretamente para balão volumétrico de 100 mL. Dissolveu-se em MeOH grau CLAE e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se solução na concentração final de 250 $\mu\text{g/mL}$. Essa solução foi injetada no sistema cromatográfico conforme indicado na Tabela 15.

Tabela 15. Correspondência entre os volumes e as massas injetadas para construção da curva analítica do ácido benzoilgrandiflórico, conforme a concentração da solução de referência.

Volume (μl)	Massa (μg)
Solução de referência 250 $\mu\text{g/mL}$	
4,0	1,0
8,0	2,0
16,0	4,0
24,0	6,0
32,0	8,0

Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.9.5.1.

Ácido cinamoilgrandiflórico

Pesaram-se, precisamente, cerca de 10,0 mg de ácido cinamoilgrandiflórico diretamente para balão volumétrico de 100 mL. Dissolveu-se em MeOH grau CLAE e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se solução na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Essa solução foi injetada no sistema cromatográfico conforme indicado na Tabela 16.

Tabela 16. Correspondência entre os volumes e as massas injetadas para construção da curva analítica do ácido cinamoilgrandiflórico, conforme a concentração da solução de referência.

Volume (µl)	Massa (µg)
Solução de referência 100,0 µg/mL	
5,0	0,5
10,0	1,0
15,0	1,5
20,0	2,0
30,0	3,0

Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.9.5.1.

Ácido caurenóico

Pesaram-se, precisamente, cerca de 4,0 e 5,0 mg de ácido caurenóico diretamente para balões volumétricos de 25 e 10 mL, respectivamente. Dissolveu-se em metanol grau CLAE e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se soluções nas concentrações finais de 160 e 500 µg/mL. Essa solução foi injetada no sistema cromatográfico conforme indicado na Tabela 17.

Tabela 17. Correspondência entre os volumes e as massas injetadas para construção da curva analítica do ácido caurenóico, conforme a concentração da solução de referência.

Volume (µl)	Massa (µg)
Solução de referência 100,0 µg/mL	
5,0	0,8
15,0	2,4
Solução de referência 250,0 µg/mL	
8,0	4,0
16,0	8,0
24,0	12,0

Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.9.5.1.

4.9.5.7 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi inicialmente estimado a partir da equação que considera os parâmetros da curva analítica:

$$LQ = 10 \frac{s}{S}$$

onde:

LQ: limite de quantificação

s: desvio padrão do intercepto da curva de regressão

S: inclinação da curva analítica

A partir dos valores encontrados pela equação, o limite de quantificação foi determinado pela injeção, em quintuplicata, de massas decrescentes de cada marcador químico (0,025–0,7 µg), obtidas por diluições sequenciais das soluções estoque (50–250 µg/mL) (item 4.9.5.4.2) ou por ajustes no volume de injeção. A Tabela 18 apresenta a correspondência entre os volumes e massas injetadas para cada marcador químico, a partir das soluções de referência diluídas. Os limites de quantificação foram determinados a partir da menor área dos picos que apresentaram precisão adequada ($DPR < 2,0\%$).

Tabela 18. Correspondência entre os volumes e as massas injetadas de soluções de referência para determinação do limite de quantificação dos marcadores químicos de *M. laevigata* e *M. glomerata*.

Concentração final das diluições das soluções estoque ($\mu\text{g/mL}$)	Volume de injeção (μL)	Massa injetada (μg)
Ácido <i>o</i>-cumárico		
20,00	5,0	0,100
10,00	5,0	0,050
10,00	4,5	0,045
10,00	4,0	0,040
Cumarina		
20,00	10,0	0,200
20,00	5,0	0,100
10,00	5,0	0,050
5,00	5,0	0,025
Ácido benzoilgrandiflórico		
125,00	4,0	0,500
62,50	4,0	0,250
50,00	4,0	0,200
Ácido cinamoilgrandiflórico		
20,0	5,0	0,100
10,0	5,0	0,050
5,0	5,0	0,025
2,5	5,0	0,0125
Ácido caurenóico		
160,0	5,0	0,800
160,0	4,4	0,700

Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.9.5.1.

4.9.5.8 Limite de detecção

A estimativa do limite de detecção foi realizada a partir dos dados da curva analítica, utilizando-se a seguinte equação:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S}$$

onde:

LQ: limite de detecção

s: desvio padrão do intercepto da curva de regressão

S: inclinação da curva analítica

O limite de detecção também foi determinado pela injeção, em quintuplicata, de massas decrescentes de cada marcador químico (0,007 – 0,24 µg), obtidas por diluições sequenciais das soluções estoque (50 – 250 µg/mL) (item 4.9.5.4.2). O limite de detecção foi estabelecido como a menor massa injetada detectável, que proporcionou altura do pico do analito com relação sinal-ruído (S/N) de 3.

4.9.5.9 Estabilidade dos marcadores químicos

A estabilidade dos marcadores químicos nas amostras preparadas (item 4.9.5.2), foi avaliada mantendo-se as soluções no carrossel do cromatógrafo, à temperatura ambiente (23 ± 2 °C), as quais foram analisadas sequencialmente nos intervalos de 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 e 42 horas.

As concentrações dos marcadores químicos foram calculadas em cada intervalo de tempo e submetidas à análise de variância pelo teste de F ($p < 0,05$), sendo as médias dos dados comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.9.5.10 Precisão

Avaliou-se a precisão intra-dia e inter-dia. A precisão intra-dia foi verificada por meio de seis determinações a 100% da concentração dos marcadores químicos no material vegetal ($n = 6$). Amostras de *M. glomerata* e *M. laevigata* foram preparadas segundo descrito no item 4.9.5.1. Da mesma maneira, a precisão inter-dia foi determinada em dois dias consecutivos, com analistas diferentes ($n = 12$).

A concentração de cada composto no material vegetal foi determinada e o DPR foi calculado. As médias dos teores entre os dois dias de determinações foram comparadas pelo teste *t* ($p < 0,05$).

4.9.5.11 Exatidão

Os testes de recuperação foram estudados pela fortificação das drogas vegetais com quantidades conhecidas das substâncias de referência. Para isso, foram preparadas soluções etanólicas das substâncias de referência na concentração de 2,0 mg/mL cada. Volumes diferentes das soluções, contendo massas conhecidas das substâncias, foram adicionados

diretamente a 1,0 g do pó do material vegetal, conforme discriminado na Tabela 18 para cada marcador químico.

Cumarina e ácido *o*-cumárico foram fortificados em três níveis de concentração, em triplicata para cada nível. Para os diterpenos caurânicos, devido à limitada disponibilidade das substâncias de referência, os estudos de recuperação foram realizados em um único nível de concentração, também em triplicata. Após a fortificação, soluções foram preparadas e analisadas como descrito nos itens 4.9.5.2 e 4.9.5.1, respectivamente.

Amostras dos materiais vegetais ($n = 3$) não fortificadas também foram preparadas para a determinação da massa recuperada.

Tabela 19. Correspondência entre os volumes e as massas das substâncias de referência adicionadas às drogas vegetais nos estudos de exatidão (recuperação) dos marcadores químicos em *M. laevigata* e *M. glomerata*.

Solução etanólica do analito (2,0 mg/mL)	Volume (µL) de solução adicionado à droga vegetal	Massa (mg) adicionada à droga vegetal
Ácido <i>o</i> -cumárico	125	0,25
	500	1,00
	1000	2,00
Cumarina	250	0,50
	750	1,50
	1250	2,50
Ácido benzoilgrandiflórico	750	1,50
Ácido cinamoilgrandiflórico	250	0,50
Ácido caurenóico	500	1,00

Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.9.5.1.

4.9.5.12 Robustez

Seis soluções extrativas de cada espécie foram preparadas (item 4.9.5.2) e analisadas empregando a condição analítica estabelecida (item 4.9.5.1) e com alterações deliberadas nas condições de análise nos seguintes parâmetros: temperatura da coluna (26 °C e 28 °C); lote de coluna e analistas diferentes. Os parâmetros modificados foram avaliados individualmente.

As concentrações, a resolução (R_s) e o fator de cauda (T) dos picos correspondentes aos marcadores químicos foram determinados e os dados submetidos à análise de variância ($p < 0,05$), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A pureza dos picos correspondentes aos marcadores químicos foi avaliada a partir das sobreposição dos espectros no UV obtidos nas regiões ascendente, apical e descendente de cada pico.

4.9.6 Variação sazonal dos teores de marcadores químicos em folhas de *M. laevigata* e *M. glomerata* cultivadas sob três níveis de sombreamento

M. laevigata e de *M. glomerata* foram cultivadas sob três níveis de interceptação da radiação solar (0%, 40% e 80% de sombreamento), conforme descrito no item 4.6. Foram coletadas folhas de ambas as espécies, nas diferentes estações do ano, nos meses de maio (outono), agosto (inverno), novembro (primavera) e fevereiro (verão), de plantas com idade de 45, 48, 51 e 54 meses, respectivamente.

A coleta das folhas foi feita a partir das seções apical, basal e intermediária das plantas ($n = 6$), obtendo-se uma amostra composta do material vegetal para cada indivíduo, de ambas as espécies.

As folhas de *M. laevigata* e de *M. glomerata* foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C, por 72 h. O material vegetal foi pulverizado em moinho de facas, tamisado em peneira de 20 mesh e acondicionados em freezer (-20 °C) em embalagens plásticas do tipo *zip bag* contendo cerca de 1,0 g, até a análise.

O preparo das amostras e as análises foram realizados conforme descrito nos itens 4.9.5.2 e 4.9.5.1, respectivamente. Os teores dos marcadores químicos nas amostras foram calculados usando um fator de resposta, conforme Snyder *et al.* (1997).

O delineamento estatístico foi em parcelas subdivididas no tempo, compreendendo 3 tratamentos (sombreamento) e 4 épocas de colheita, sendo o sombreamento estudado na parcela e estação na subparcela. A subparcela constou, também, da interação do sombreamento \times estações, para verificar possível influência de um fator sobre o outro. Os teores dos marcadores químicos determinados em cada tratamento ($n = 6$) foram submetidos à análise de variância pelo teste de F ($p < 0,05$). Quando a interação sombreamento \times estações foi significativa, procedeu-se ao desdobramento da parcela (sombreamento) dentro das subparcelas (estações) pela análise de variância pelo teste de F ($p < 0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Quando a interação não foi significativa, as

médias dos tratamentos para dados qualitativos (estações do ano) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) e para dados quantitativos (sombreamento), os dados foram submetidos à análise de regressão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* Sisvar[®], versão 5.0 (FERREIRA, 2007).

4.9.7 Estabilidade química das drogas vegetais *M. laevigata* e *M. glomerata* durante armazenamento

M. laevigata e de *M. glomerata* foram cultivadas sob três níveis de interceptação da radiação solar (0%, 40% e 80%, $n = 6$ para cada), conforme descrito no item 4.6.

As folhas foram coletadas das seções apical, basal e intermediária de plantas com 45 meses de idade, obtendo-se uma amostra composta do material vegetal para cada indivíduo de ambas as espécies. As folhas foram acondicionadas diretamente em sacos de papel Kraft e secas em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C, por 72 h. Após a secagem, os sacos de papel Kraft contendo o material vegetal foram embalados em sacos plásticos de polipropileno e acondicionados em ambiente escuro, com temperatura e umidade relativa médias de 25 °C \pm 5 °C e 54% \pm 20%, respectivamente, aferidas por termohigrômetro.

M. glomerata e *M. laevigata* foram armazenadas por um período máximo de 12 e 18 meses, respectivamente, sendo as concentrações dos marcadores químicos determinadas em intervalos de 3 meses.

Ao final de cada intervalo de 3 meses, amostras do material vegetal foram pulverizadas em moinho de facas, tamisadas em peneira de 0,85 mm e acondicionadas em freezer (-20 °C) em embalagens plásticas do tipo *zip bag*, contendo cerca de 1,0 g de pó, até a análise. O preparo das amostras e as análises foram realizados conforme descrito nos itens 4.9.5.2 e 4.9.5.1, respectivamente. Os teores dos marcadores químicos nas amostras foram calculados usando fator de resposta, conforme Snyder *et al.*, 1997.

O delineamento estatístico para cada espécie foi inteiramente casualizado, com 6 repetições, sendo 5 tratamentos para *M. glomerata* [T₀ (controle); T₃ (3 meses); T₆ (6 meses); T₉ (9 meses); T₁₂ (12 meses)] e 7 tratamentos para *M. laevigata* [T₀ (controle); T₃ (3 meses); T₆ (6 meses); T₉ (9 meses); T₁₂ (12 meses); T₁₅ (15 meses) e T₁₈ (18 meses)]. As concentrações dos marcadores químicos foram determinadas e os dados obtidos foram

submetidos à ANOVA pelo teste de F ($p < 0,05$) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o software Sisvar[®], versão 5.0 (FERREIRA, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE QUALITATIVA DE CONSTITUINTES QUÍMICOS EM *M. laevigata* E *M. glomerata*

Os extratos etanólicos obtidos para as duas espécies de *Mikania* em estudo foram, inicialmente, avaliados por CLAE-FR, empregando-se condição cromatográfica em gradiente exploratório (item 4.8.3). Estas análises foram realizadas objetivando-se identificar diferenças qualitativas na composição química, a fim de orientar o isolamento e caracterização de marcadores químicos das espécies. Os perfis cromatográficos obtidos estão representados na Figura 5.

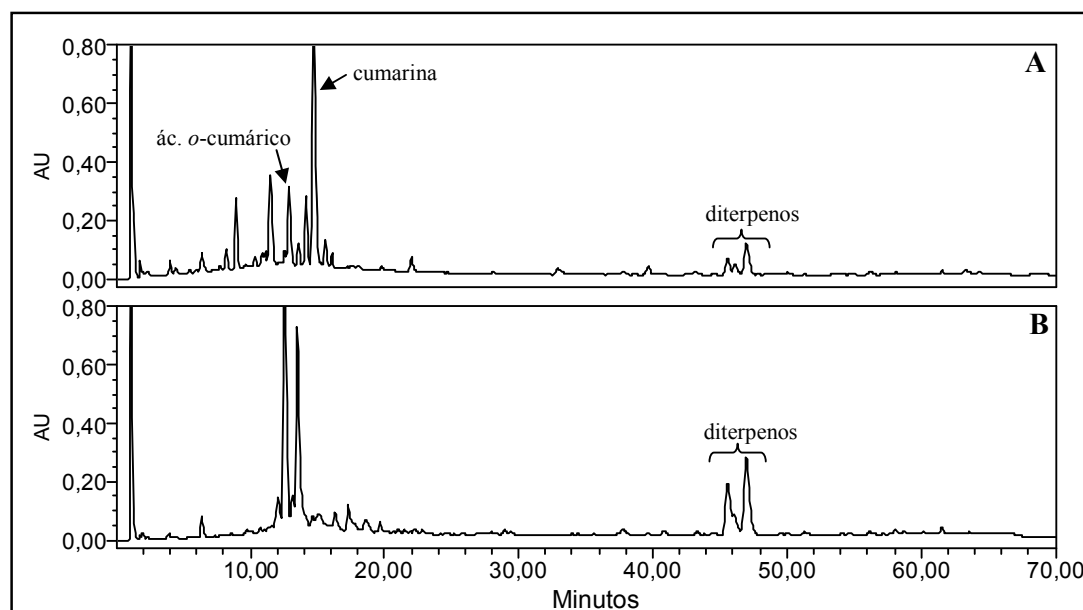


Figura 5. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR para os extratos etanólicos de (A) *M. laevigata* e (B) G_1 de *M. glomerata*. **Condições cromatográficas:** vide Parte Experimental, item 4.8.3.2.

No perfil de ambas as espécies, em condições exploratórias, nota-se o predomínio de picos no intervalo de 0 a 20 min, correspondentes às substâncias de maior polaridade. No intervalo entre 20 e 42 min não foi observada a presença de picos com intensidade significativa e entre 45 e 50 min foram detectados compostos de baixa polaridade, com picos mais intensos em *M. glomerata*.

A cumarina (**33**), com TR = 14,54 min, foi identificada como o pico majoritário presente no extrato etanólico de *M. laevigata*, não sendo detectada no cromatograma obtido para *M. glomerata*. Diversos autores afirmam que **33** é o principal constituinte químico dos guacos (OLIVEIRA *et al.*, 1984; VILLEGAS *et al.*, 1997a; CELEGUINI *et al.*, 2001); porém, no presente trabalho, **33** não foi detectada em *M. glomerata*.

Outra diferença marcante entre as espécies foi a presença de ácido *o*-cumárico (**42**) (TR = 12,69 min) em *M. laevigata*, ausente em *M. glomerata*. Ácido *o*-cumárico é um precursor biossintético de **33**, o que justifica sua presença em *M. laevigata*, uma vez que essa espécie apresentou altas concentrações de **33**.

Análises por CG-EM realizadas por Yatsuda *et al.* (2005) com o extrato hexânico metilado de *M. glomerata*, indicaram ácido caurenóico (**2**) como constituinte majoritário da espécie. A presença desse ácido também foi relatada por Oliveira *et al.* (1984), Vilegas *et al.* (1997a) e Yatsuda *et al.* (2005) para *M. laevigata*. Análises por CLAE dos extratos de ambas as espécies, e sua comparação com cromatograma obtido empregando-se ácido caurenóico como substância de referência, mostraram que os picos registrados no intervalo de 45 a 50 min poderiam corresponder a compostos da classe dos diterpenos caurânicos. A comparação das áreas dos picos correspondentes a essas substâncias nos cromatogramas obtidos para as duas espécies de guaco indica que elas ocorrem em maiores concentrações em *M. glomerata*.

4.2 CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA E ESPECTROMÉTRICA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *M. laevigata* E *M. glomerata*

4.2.1 LH₁A e L₃F (cumarina, **33**)

LH₁A (6,76 g) foi obtido por filtração em sílica gel com hexano do extrato etanólico bruto de *M. laevigata* (item 4.8.5.1). LH₁A apresentou-se como um sólido branco amarelado com forte odor característico de cumarina. Análises por CLAE-FR dessa fração e co-injeção com cumarina de referência (1,2-benzopirona) indicaram a presença majoritária dessa substância nesse grupo e de outros picos de baixa intensidade com polaridade similar à cumarina em LH₁A. Devido à presença de interferentes que dificultavam a purificação, essa fração não foi trabalhada.

L₃F (191,1 mg) foi obtido a partir do grupo L₂ de *M. laevigata*, por fracionamento em coluna aberta de sílica gel eluída com hexano:diclorometano 1:1 (item 4.8.5.3). Essa substância foi obtida como um sólido cristalino branco, com odor característico de cumarina, e faixa de fusão de 70 a 72°C.

A análise das amostras LH₁A e L₃F, por CCD de sílica gel, empregando-se cumarina como substância de referência e sistema de eluição tolueno:clorofórmio:acetona (20:10:15), sugeriu tratar-se da cumarina, em função da presença da mancha com valor de R_f semelhante à cumarina de referência, a qual apresentou intensa fluorescência azul sob luz UV₃₆₅, após exposição a vapores de amônio (WAGNER *et al.*, 1984).

Análises por CLAE-FR de L₃F e co-injeção com cumarina de referência indicaram sobreposição e aumento da área do pico. A análise dos espectros no ultravioleta obtidos *on-line* para os picos de L₃F e da cumarina de referência indica que ambos são idênticos, principalmente pelas bandas, em aproximadamente 277 e 315 nm, características da cumarina (Figura 6).

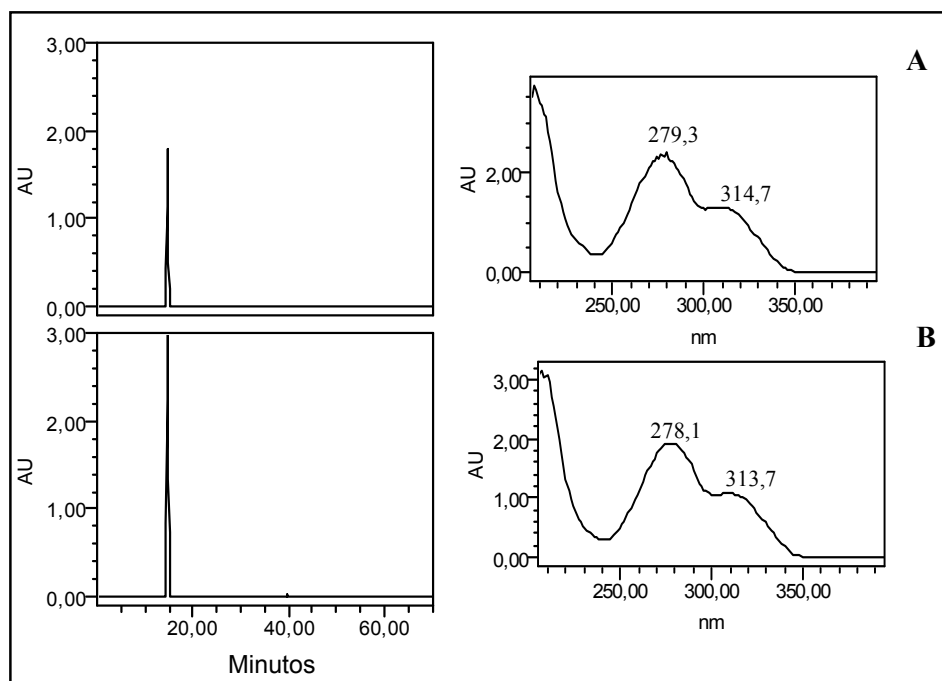


Figura 6. Cromatogramas e espectros no UV obtidos *on-line* por CLAE-FR para L₃F (A) e para a cumarina (B, substância de referência). **Condições cromatográficas:** vide Parte Experimental, item 4.8.3.2.

A fim de confirmar a identidade da substância isolada como sendo cumarina, foram obtidos dados espectrais para L₃F. No espectro de L₃F obtido no infravermelho observaram-se bandas de absorção em 1602, 1562, 1486 e 1451 cm⁻¹, características de estiramento de C=C de anel aromático, e banda de absorção em 3057 cm⁻¹ característica de estiramentos de ligações C-H (Figura 7). A observação de bandas de absorção intensa nas regiões de 825 e 754 cm⁻¹ indicam a presença de anel aromático substituído com dois e quatro hidrogênios adjacentes (DYER, 1977; SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). Observou-se, ainda, presença de um duplete intenso em aproximadamente 1750 cm⁻¹, característico de deformação axial C=O de σ -lactonas característico do fenômeno conhecido como ressonância de Fermi (DYER, 1977; SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). Bandas características de deformação axial da ligação C-O de lactonas foram observadas em 1258, 1174 e 1120 cm⁻¹ (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). A banda de absorção intensa centrada em 1619 cm⁻¹, característica de vibrações de deformação axial de ligação dupla carbono-carbono conjugada com anel aromático, corrobora a presença de anel aromático em L₃F (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

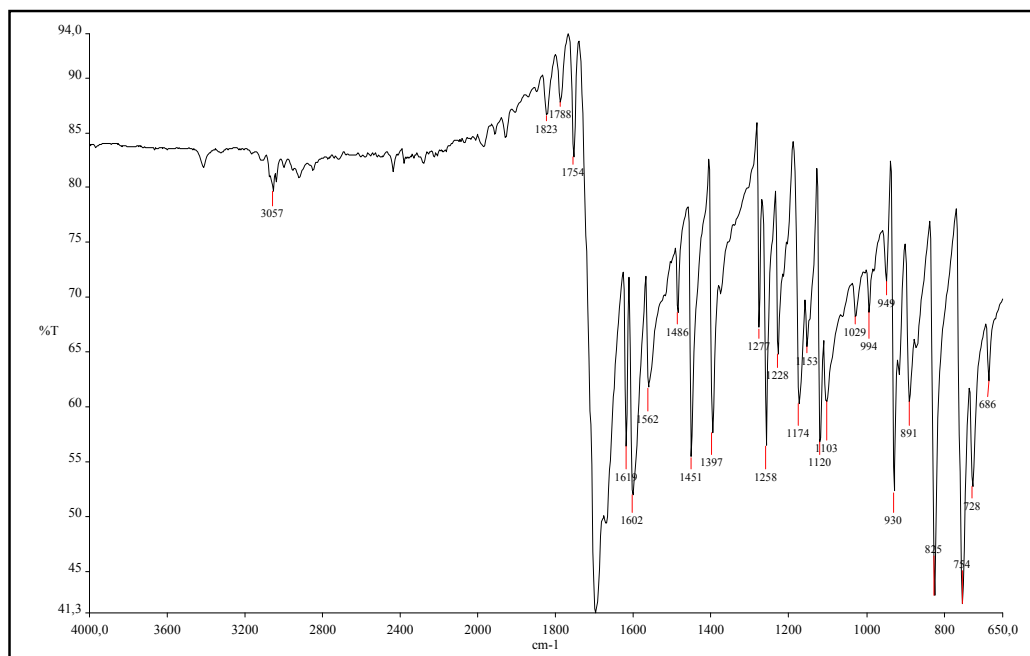


Figura 7. Espectro de absorção no infravermelho obtido para L₃F.

A comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos para L_3F com valores relatados para a cumarina (ROWBOTHAM; SCHAEFER, 1972; KUPRIYANOVA, 1997) possibilitaram confirmar a identificação de L_3F .

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (50 MHz, CDCl_3) (Figura 8, Tabela 20) apresentou seis sinais característicos de carbonos aromáticos e dois sinais de carbonos olefinicos, cuja natureza desses foi deduzida a partir do subespectro DEPT-135 (Figura 8) como sendo seis carbonos metínicos e três carbonos não-hidrogenados. A presença de sinal referente a grupo carbonila em δ_{C} 160,90 ppm, atribuído a C2, e oito sinais característicos de carbonos aromáticos no intervalo de δ_{C} 116,81 a 154,17 ppm confirmam a identificação de L_3F como cumarina (**33**).

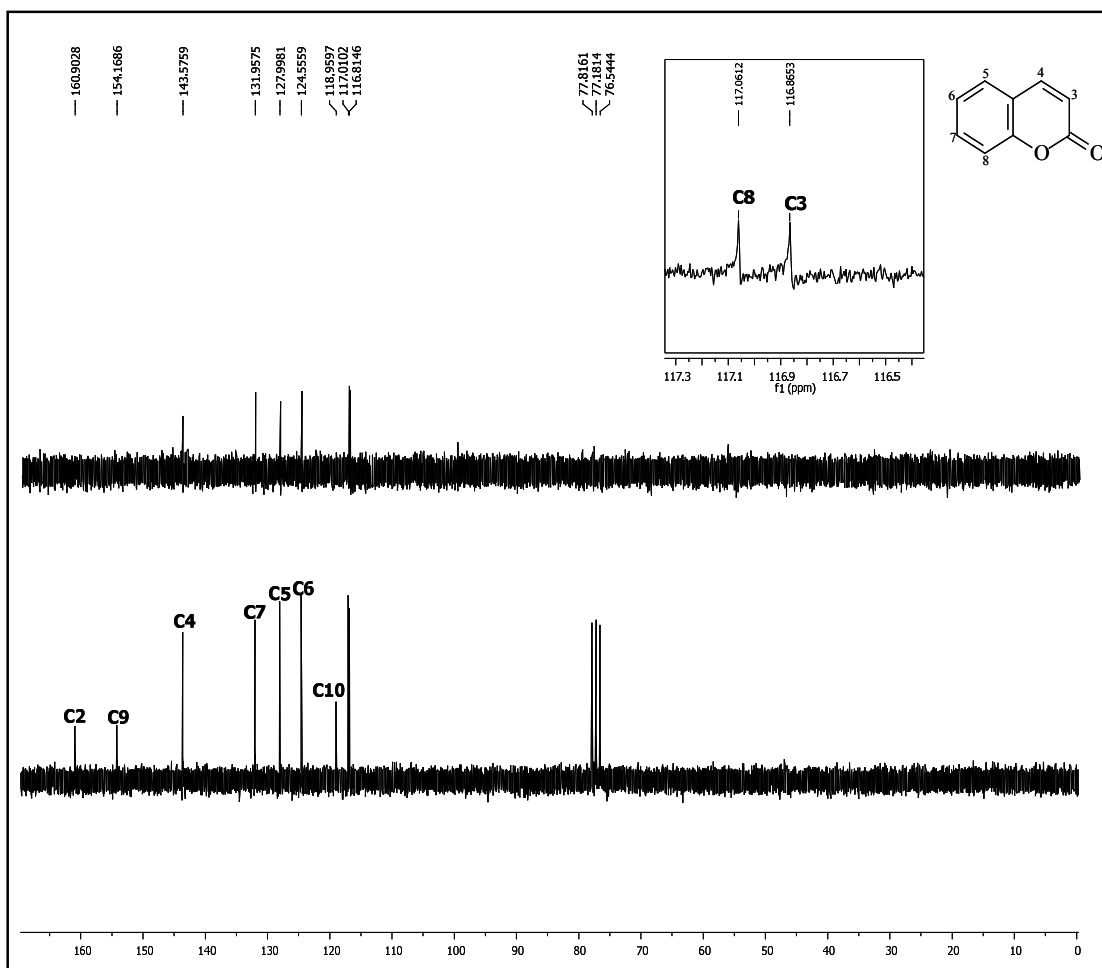


Figura 8. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 de L_3F (50 MHz, CDCl_3).

Tabela 20. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para L_3F e comparação com dados relatados para a cumarina.

Carbono	L_3F (δ_{C} , ppm) ^a	Cumarina (33) (δ_{C} , ppm) ^b	DEPT-135
2	160,90	160,4	C
3	116,86	116,4	CH
4	143,58	143,6	CH
5	127,99	128,1	CH
6	124,56	124,4	CH
7	131,96	131,4	CH
8	117,06	116,4	CH
9	154,17	153,9	C
10	118,96	118,8	C

Nota: ^aDados obtidos no presente trabalho (50 MHz, CDCl_3) ^bDados relatados por Kupriyanova (1997) (50 MHz, CDCl_3).

O espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 9, Tabela 21) apresentou sinais característicos de hidrogênios aromáticos, com integral referente a quatro átomos de hidrogênio. Os dupletos centrados em δ_{H} 6,42 e 7,71 ppm, com integral de 1H cada, apresentam valor de constante de acoplamento escalar (J 9,53 Hz) característico de hidrogênios olefínicos de ligação *cis*, adjacentes à carbonila do anel lactônico, sendo atribuídos a H3 e H4, respectivamente. Os sinais referentes a dois multipletos (δ_{H} 7,24-7,35 e 7,48-7,54 ppm), com integral de 2H cada, foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos H5 – H8. Esses dados corroboram a identificação de L_3F como cumarina (33) (ROWBOTHAM; SCHAEFER, 1972).

Tabela 21. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H obtido para L_3F e comparação com dados da literatura para a cumarina.

Hidrogênio	δ_{H} (ppm) [multiplicidade; integral; J (Hz)]	
	$\text{L}_3\text{F}^{\text{a}}$	Cumarina ^b (33)
3	6,42 (d, 1H, $J_{3,4}$ 9,53)	6,36 ($J_{3,4}$ 9,58)
4	7,71 (d, 1H)	7,70
5	7,47-7,52 (m, 1H, $J_{5,6}$ 7,8)	7,46 ($J_{5,6}$ 7,70)
6	7,32-7,36 (m, 1H, $J_{6,7}$ 7,3)	7,23 ($J_{6,7}$ 7,39)
7	7,53-7,58 (m, 1H, $J_{7,8}$ 8,34)	7,47 ($J_{7,8}$ 8,38)
8	7,24-7,32 (m, 1H)	7,22

Nota: ^aDados obtidos no presente trabalho (200 MHz, CDCl_3). ^bDados relatados por Rowbotham e Schaefer (1972) (100 MHz, CDCl_3).

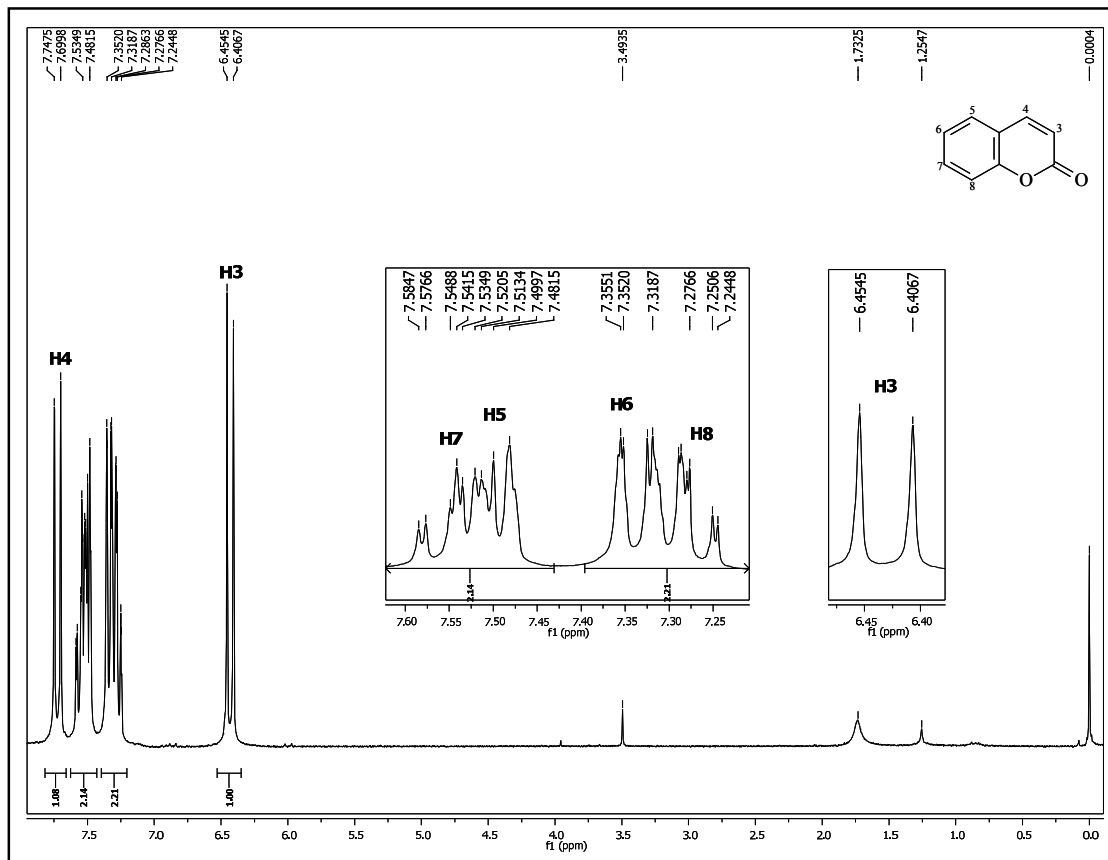


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H de L_3F (200 MHz, CDCl_3).

4.2.2 E_6 (mistura β -sitosterol, 38, e estigmasterol, 34)

E_6 (54,2 mg) foi obtido a partir da purificação do grupo L_3H de *M. laevigata* (item 4.8.5.4) por cromatografia em coluna aberta de sílica gel, empregando-se hexano:DCM 40:60 como eluente (item 4.8.5.5). E_6 apresentou-se como um sólido branco com faixa de fusão de 143,4 a 144,1 °C. A análise desse sólido por CCD de sílica gel, utilizando-se β -sitosterol de referência, e sistema de eluição hexano:EtOAc (80:20), indicou a natureza esteroidal de E_6 , após revelação com reagente de Liebermann-Burchard e valor de R_f semelhante à substância de referência empregada.

A análise do espectro no infravermelho de E_6 (Figura 10) confirmou sua natureza alifática pela presença de bandas intensas em 2960, 2933 e 2863 cm^{-1} , atribuídas a deformação axial de C-H de carbono alifático, e ausência de absorções características de sistemas aromáticos (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA *et al.*, 2001). A banda larga

na região de 3600-3200 cm^{-1} , centrada em 3424 cm^{-1} , foi atribuída ao estiramento O-H (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA *et al.*, 2001). A presença de hidroxila foi confirmada pela absorção em 1052 cm^{-1} , atribuída à deformação axial de C-O de álcool secundário alicíclico de seis átomos (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA *et al.*, 2001). A banda intensa em 1459 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular simétrica no plano, de ligação C-H em grupo metilênico (CH_2) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA *et al.*, 2001).

O duplete intenso com picos de intensidades semelhantes em 1381 e 1367 cm^{-1} foi atribuído à deformação angular no plano e fora do plano de grupo dimetila geminal, correspondentes às metilas posicionadas nos C26 e C27 do β -sitosterol e estigmasterol (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). As bandas de absorções em 970 e 958 cm^{-1} foram atribuídas à presença de olefina dissustituída *trans*, característico dos carbonos olefinicos C22 e C23 do estigmasterol e as bandas em 838 e 800 cm^{-1} a olefina trissustituída, correspondente aos carbonos olefinicos C5 e C6 de ambos os esteróides (DYER, 1977).

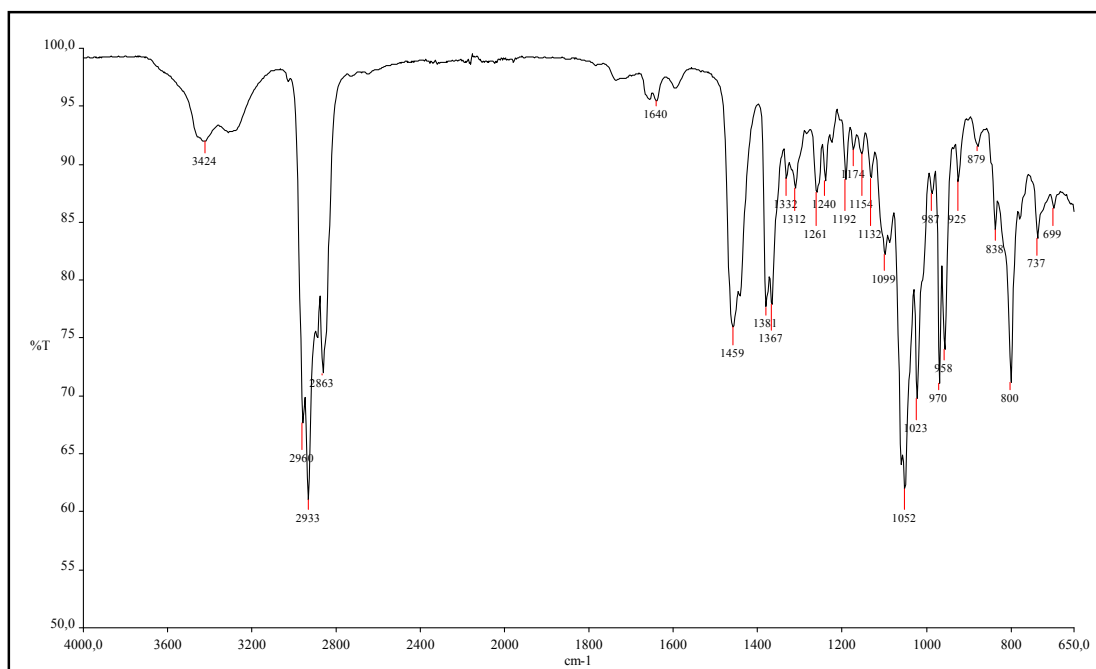


Figura 10. Espectro de absorção no infravermelho obtido para E₆.

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (100 MHz, CDCl_3) obtido para E₆ (Figura 11, Tabela 22) apresentou sinais que permitiram confirmar seu caráter esteroidal, sendo a natureza dos carbonos deduzida a partir do subespectro DEPT-135. A atribuição dos sinais

baseou-se na comparação com dados relatados para a mistura desses esteróides (GOULART *et al.*, 1993; KONGDUANG *et al.*, 2008).

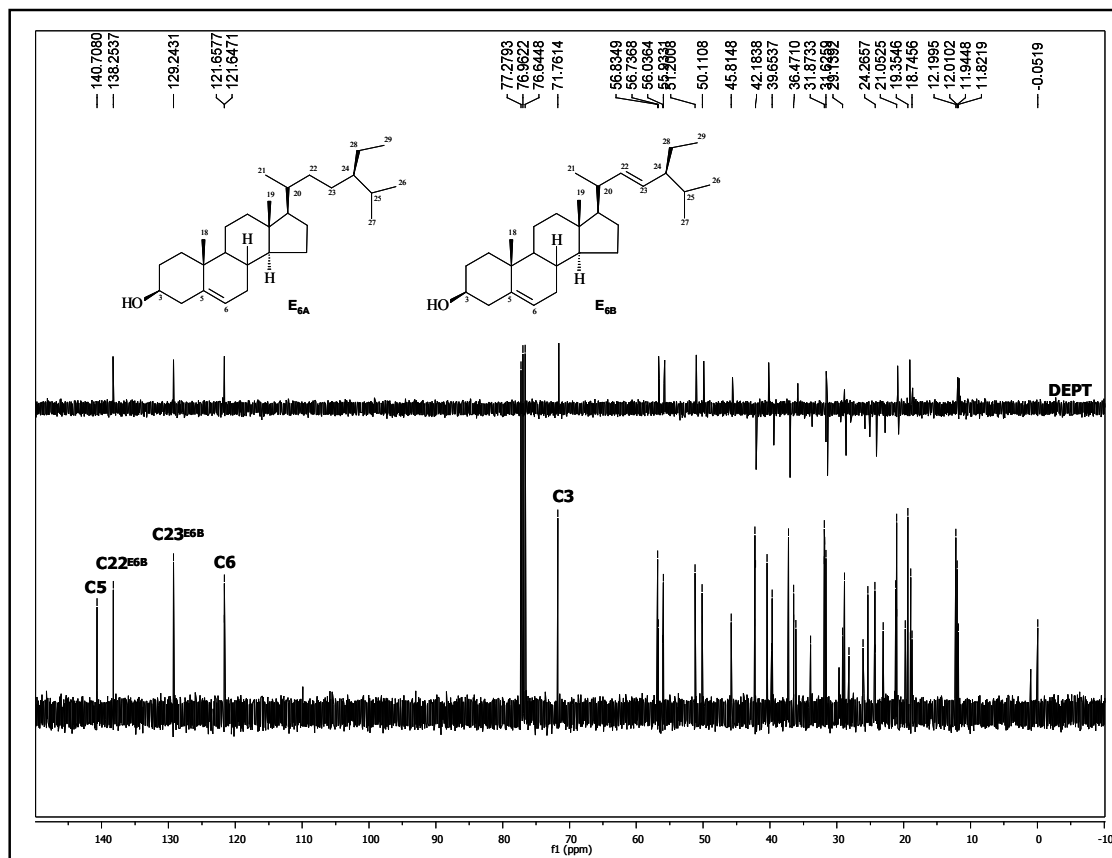


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 obtido para E_6 (100 MHz, CDCl_3).

Assim, os sinais em δ_{C} 140,71 e 121,66 ppm foram atribuídos, respectivamente, aos carbonos olefinicos C5 e C6, comuns aos esqueletos do β -sitosterol (**38**) e estigmasterol (**34**). Os sinais em δ_{C} 138,25 e 129,24 ppm foram atribuídos, respectivamente, aos carbonos olefinicos C22 e C23, característicos do estigmasterol (GOULART *et al.*, 1993; KONGDUANG *et al.*, 2008). O sinal em δ_{C} 71,76 ppm foi atribuído aos carbonos carbinólicos em C3 de ambos os esteróides (GOULART *et al.*, 1993; KONGDUANG *et al.*, 2008). A atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C está descrita na Tabela 22.

A ocorrência de ambos os esteróides já foi previamente relatada para *M. glomerata* (OLIVEIRA *et al.*, 1984; SANTOS *et al.*, 1998; VENEZIANI *et al.*, 1999), mas nenhum relato sobre a presença dessas substâncias em *M. laevigata* foi encontrado na revisão bibliográfica realizada. Obtenção de mistura de β -sitosterol e estigmasterol tem sido descrita

por diversos autores para várias espécies vegetais, tais como *Ochroma lagopus* Swartz, Bombacaceae (PAULA *et al.*, 1998); *Eupatorium betonicaeforme* (D.C.) Baker, Asteraceae (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006) e *Conchocarpus heterophyllus* (A. St.-Hil.), Rutaceae (AMBROSIN *et al.*, 2008).

Tabela 22. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para E₆ e comparação com dados da literatura para a mistura β -sitosterol e estigmasterol.

Carbono	δ_{C} (ppm)				DEPT-135
	E _{6A} ^a	β -sitosterol ^b (38)	E _{6B} ^c	Estigmasterol ^d (34)	
1	37,29	37,25	37,29	37,25	CH ₂
2	31,68	31,64	31,68	31,64	CH ₂
3	71,76	71,81	71,76	71,81	CH
4	42,33	42,29	42,33	42,29	CH ₂
5	140,71	140,73	140,78	140,73	C
6	121,66	121,72	121,66	121,72	CH
7	31,87	31,89	31,87	31,89	CH ₂
8	31,87	31,89	31,87	31,89	CH
9	50,11	50,12	50,11	50,12	CH
10	36,47	36,40	36,47	36,40	C
11	21,09	21,08	21,09	21,08	CH ₂
12	39,65	39,68	39,65	39,78	CH ₂
13	42,18	42,29	42,18	42,29	C
14	56,74	56,75	56,83	56,87	CH
15	24,32	24,30	24,38	24,38	CH ₂
16	28,26	28,23	28,93	28,92	CH ₂
17	56,03	56,05	55,93	55,93	CH
18	11,87	11,84	12,06	12,03	CH ₃
19	19,36	19,38	19,36	19,38	CH ₃
20	36,17	36,16	40,49	40,50	CH
21	19,03	19,03	21,23	21,20	CH ₃
22	33,98	33,94	138,25	138,40	CH ₂ /CH
23	26,13	25,99	129,24	129,27	CH ₂ /CH
24	45,81	45,83	51,20	51,23	CH
25	29,15	29,08	31,87	31,89	CH
26	18,75	18,76	19,00	19,00	CH ₃
27	19,77	19,81	19,00	19,00	C
28	23,10	23,06	25,41	25,42	CH ₂
29	12,20	11,99	12,25	12,27	CH ₃

Legenda:^{a,c}Dados obtidos no presente trabalho (100 MHz, CDCl₃). ^{b,d}Dados relatados por Goulart *et al.* (1993) (50 MHz, CDCl₃) e Kongduang *et al.* (2008) (125 MHz, CDCl₃) para a mistura β -sitosterol e estigmasterol.

No espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl₃) obtido para E₆ (Figura 12, Tabela 23) observam-se diversos sinais na região de δ_{H} 0,68 a 5,35 ppm, e nenhum sinal na região de

hidrogênios aromáticos (δ_H 6,0 e 8,0 ppm), perfil compatível com a natureza esteroidal da amostra. Observa-se a presença de um multipletto e dois dupletos duplos na região característica de deslocamento químico de hidrogênios olefinicos (δ_H 4,0 a 5,5 ppm), um multipletto na região de hidrogênio oximetínico (δ_H 3,0 a 4,0 ppm) e diversos sinais na região entre δ_H 0,68 e 2,31 ppm, característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos (Figura 12) (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAIVA, *et al.*, 2001). Esse perfil espectral é compatível com substância esteroidal, corroborando a atribuição realizada para o espectro de RMN de ^{13}C supracitada (MACARI *et al.*, 1990; CARVALHO *et al.* 1998; FORGO; KÖVER, 2004).

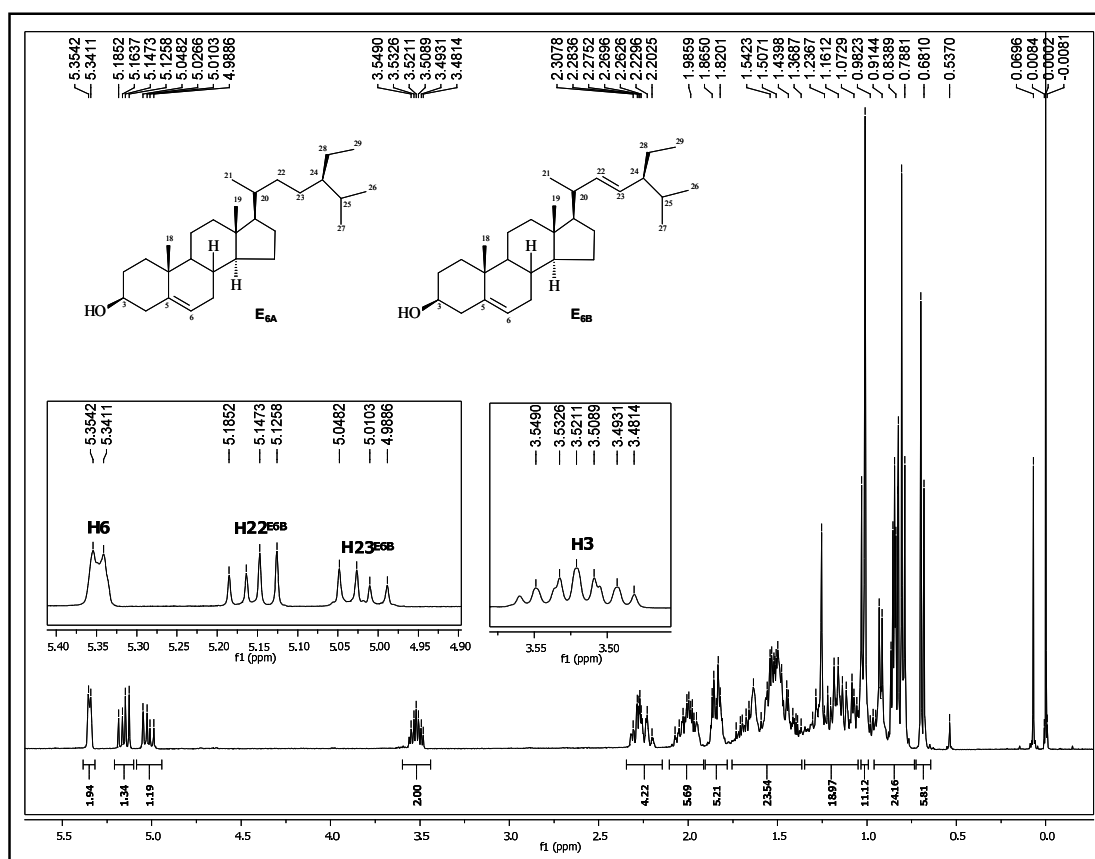


Figura 12. Espectro de RMN de 1H obtido para E₆ (400 MHz, CDCl₃).

O multipletto centrado em δ_H 5,35 ppm foi atribuído ao hidrogênio olefinico H6 presente no β -sitosterol e no estigmasterol (MACARI *et al.*, 1990; CARVALHO *et al.* 1998; FORGO; KÖVER, 2004). Os dupletos duplos centrados em δ_H 5,15 e 5,02 ppm foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H22 e H23 do estigmasterol (CARVALHO *et al.*

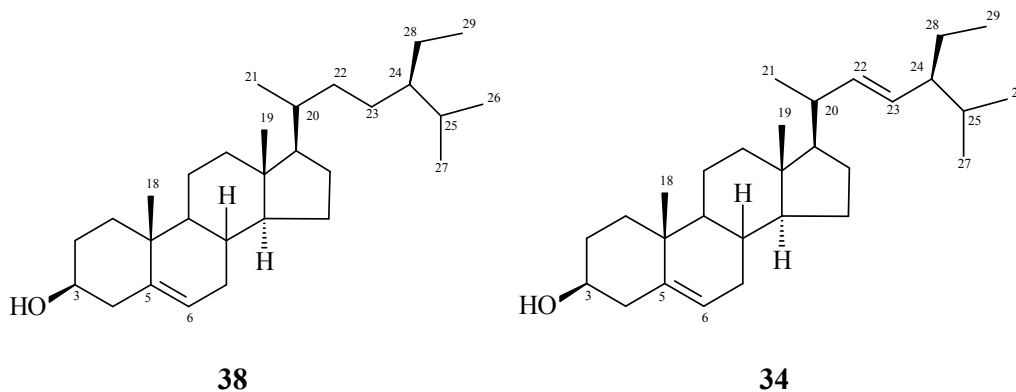
1998; FORGO; KÖVER, 2004). O multipeto centrado em δ_H 3,52 ppm foi atribuído a H3, ligado a carbono carbinólico, comuns a ambos esteróides (Tabela 23) (MACARI *et al.*, 1990; CARVALHO *et al.* 1998; FORGO; KÖVER, 2004).

Tabela 23. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H obtido para E_6 e comparação com dados relatados para β -sitosterol e estigmasterol.

H	δ_{H} (ppm) [multiplicidade; integral; J (Hz)]		
	E_6^{a}	β -sitosterol ^b (38)	Estigmasterol ^c (34)
3	3,48-3,55 (m, 2H)	3,5 (m, 1H)	3,51 (m, 1H)
6	5,34-5,35 (m, 2H)	5,2 (m, 1H)	5,34 (m, 1H)
22	5,16 (dd, 1H, $J_{22,23}$ 15,2)	-	5,17 (dd, 1H, $J_{22,23}$ 15,2)
23	5,02 (dd, 1H, $J_{23,24}$ 8,4)	-	5,04 (dd, 1H, $J_{23,24}$ 8,6)

Nota: ^aDados obtidos no presente trabalho (400 MHz, CDCl_3). Dados relatados por ^bMacari *et al.*, 1990 (200MHz, CDCl_3) e ^cForgo e Köver, 2004 (500 MHz, CDCl_3).

A partir da análise dos dados espectrais obtidos para E_6 e comparação com valores relatados para esteróides (MACARI *et al.*, 1990; GOULART *et al.*, 1993; CARVALHO *et al.* 1998; FORGO; KÖVER, 2004; KONGDUANG *et al.*, 2008) foi possível caracterizá-lo como uma mistura de β -sitosterol (38) e estigmasterol (34).



5.2.3 L_4H (ácido benzoilgrandiflórico, 39)

L_4H (404,7 mg) foi obtido a partir do fracionamento cromatográfico da fração L_3K de *M. laevigata* (item 4.8.5.5), em coluna aberta de sílica gel, empregando-se hexano:DCM 4:6 como eluente. L_4H apresentou-se como um sólido cristalino branco, com faixa de fusão entre 183,1 a 186,1 °C. Para o ácido benzoilgrandiflórico (39) foram relatados valores semelhantes de faixa de fusão, de 185 a 187 °C (FABBRI *et al.*, 1997). O cromatograma obtido por CLAE-FR para L_4H apresentou um pico majoritário com TR = 45,73 min, valor próximo ao do ácido caurenóico (TR = 47,07 min) (item 5.2.5) (Figura 13). O espectro no ultravioleta de L_4H , obtido *on-line*, apresentou duas bandas em 229,6 e 272,1 nm, indicando presença de anel aromático benzênico substituído.

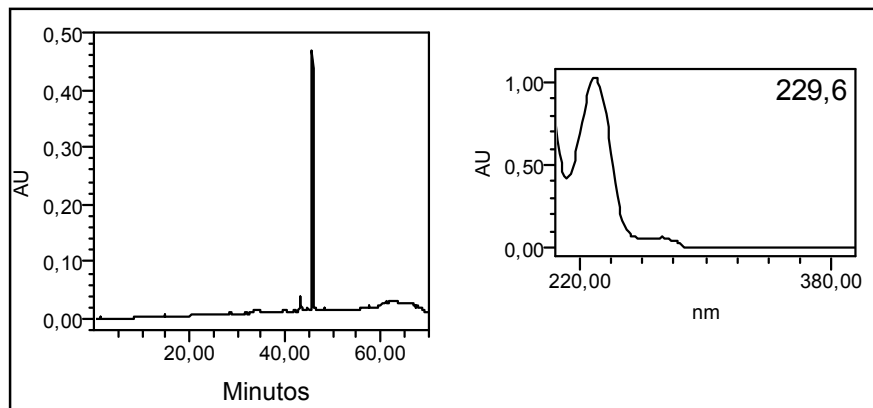


Figura 13. Cromatograma e espectro no UV obtido *on-line* por CLAE-FR para L₄H. **Condições cromatográficas:** vide Parte Experimental, item 4.8.3.2.

A análise do espectro no infravermelho obtido para L₄H (Figura 14) evidenciou presença de anel benzênico monossustituído, pela banda intensa em 705 cm⁻¹, característica de deformação angular fora do plano de anel benzênico com 5 átomos de hidrogênio adjacentes e bandas de absorções em 1602, 1583, 1461 e 1449 cm⁻¹, características de estiramentos das ligações C=C de anel aromático (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAIVA, *et al.*, 2001). Estes dados confirmam a natureza aromática da substância, como indicado pelo espectro no ultravioleta ($\lambda_{210\text{nm}}$) (PAVIA *et al.*, 2001). As bandas de absorções em 2931 e 2854 cm⁻¹ foram atribuídas às deformações axiais de C–H de grupos metílicos e metilênicos. A presença de uma banda de absorção larga na região de 3300-2400 cm⁻¹, característica de vibrações de deformação axial de O–H e de uma banda intensa em 1692 cm⁻¹, característica de estiramento C=O de ácido carboxílico, evidenciam a presença de grupo carboxila em L₄H. A banda em 1718 cm⁻¹, parcialmente sobreposta à da carbonila de ácido carboxílico, foi atribuída à carbonila de éster. A presença de éster foi confirmada pela observação de banda intensa em 1266 cm⁻¹, característica de estiramento C–O de éster. Uma banda de intensidade média centrada em 1243 cm⁻¹, parcialmente sobreposta àquela de estiramento C–O de éster foi atribuída a estiramento de C–O de ácido carboxílico (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA, *et al.*, 2001).

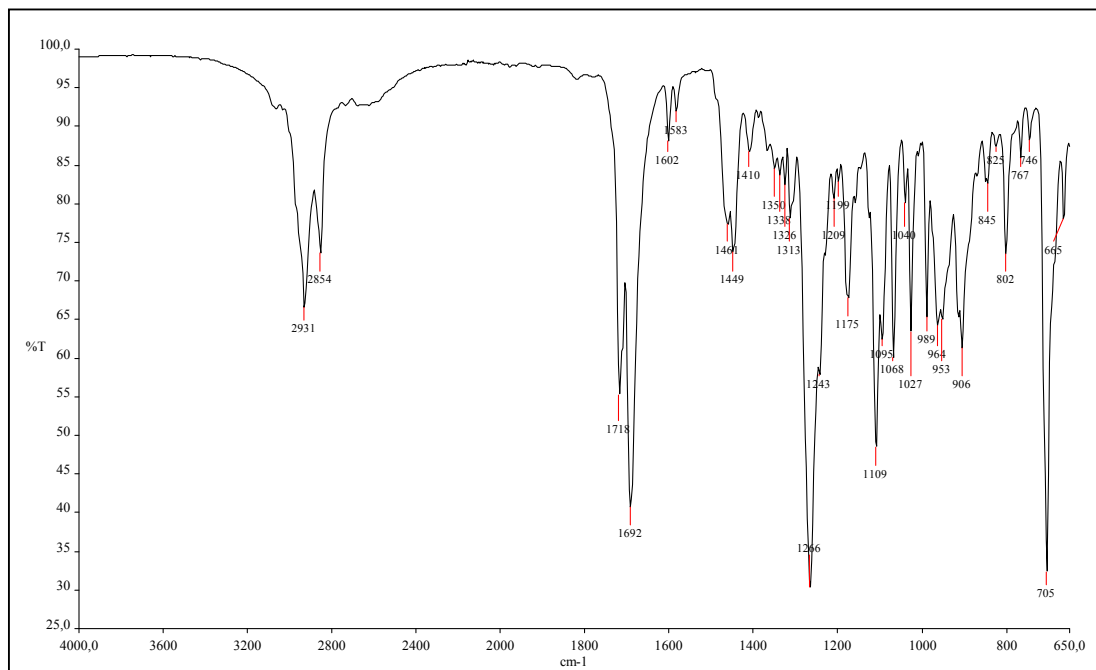


Figura 14. Espectro de absorção no infravermelho obtido para L₄H.

O espectro de RMN de ¹³C desacoplado (100 MHz, CDCl₃) obtido para L₄H (Figura 15, Tabela 24) apresentou sinais referentes a 27 átomos de carbonos. A natureza dos carbonos foi deduzida pelo subespectro DEPT-135, e indicou a presença de dois carbonos metílicos, dez carbonos metilênicos, nove carbonos metínicos e seis carbonos não-hidrogenados. Os sinais em δ_C 128,57 e 129,89 ppm foram atribuídos, respectivamente, a C4' e C3' do anel aromático.

Os sinais em δ_C 184,18 e 166,75 ppm foram atribuídos às carbonilas do ácido carboxílico e do éster, C19 e C1', respectivamente. Os sinais em δ_C 110,60 e 155,37 ppm foram atribuídos aos carbonos olefínicos, C17 e C16, respectivamente. Os carbonos aromáticos foram atribuídos aos sinais em δ_C 128,57 (C4'); 129,90 (C3'); 130,91 (C2'); e 133,04 (C5') ppm. Os demais sinais foram atribuídos pela comparação com dados descritos para o ácido benzoilgrandiflórico (**38**) (FABBRI *et al.*, 1997) (Tabela 24).

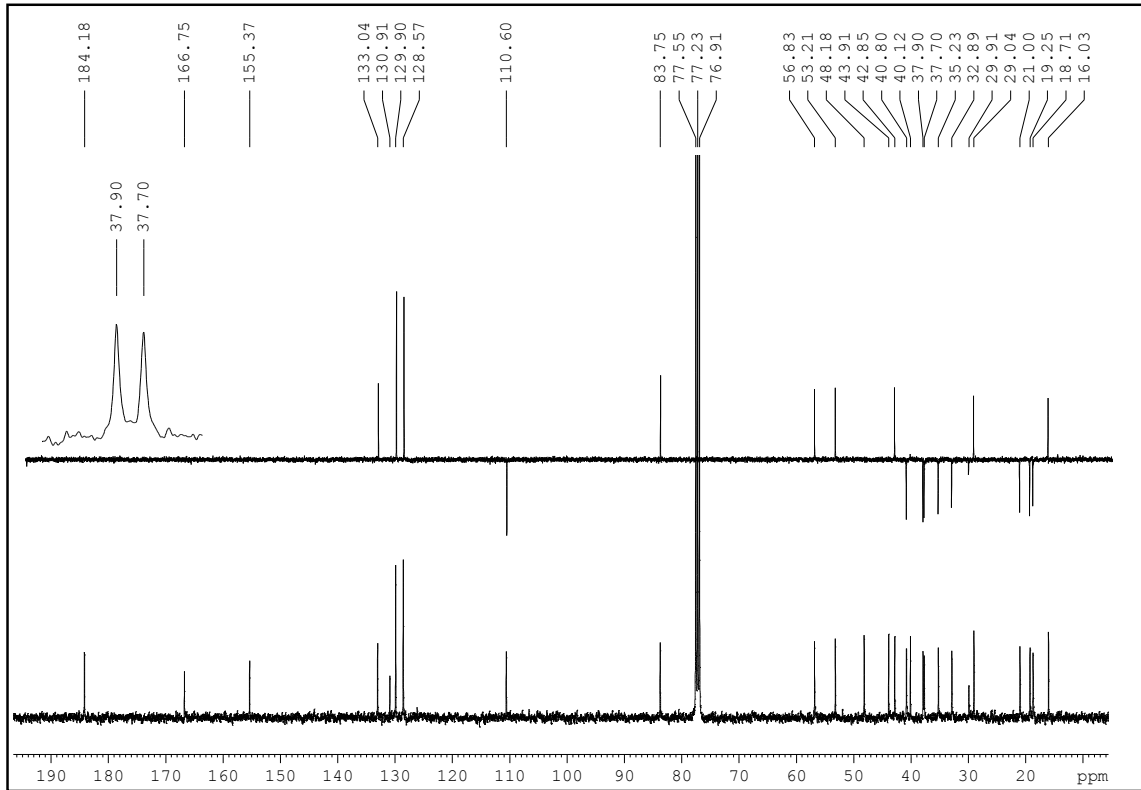


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 obtidos para L_4H (100 MHz, CDCl_3).

Tabela 24. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para L_4H .

Carbono	δ_{C} (ppm)		DEPT-135
	$\text{L}_4\text{H}^{\text{a}}$	Ac. benzoilgrandiflórico ^b (39)	
1	40,80	40,7	CH ₂
2	19,25	19,2	CH ₂
3	37,7 ou 37,9	37,4 ou 38,1	CH ₂
4	43,91	43,5	C
5	56,83	56,5	CH
6	21,00	20,9	CH ₂
7	35,23	35,1	CH ₂
8	48,18	47,9	C
9	53,21	53,0	CH
10	40,12	39,6	CH ₂
11	18,71	16,4	CH ₂
12	32,89	32,6	CH ₂
13	42,85	42,6	CH
14	37,7 ou 37,9	38,1 ou 37,4	CH ₂
15	83,75	83,5	CH
16	155,37	155,3	C
17	110,60	110,0	CH ₂
18	29,04	28,9	CH ₃
19	184,18	180,4	C
20	16,03	15,8	CH ₃
1'	166,75	166,3	C
2'	130,91	132,6	C
3'	129,90	129,5	CH
4'	128,57	128,2	CH
5'	133,04	130,7	CH

^aDados obtidos no presente trabalho (100 MHz, CDCl_3). ^bDados relatados por Fabbri *et al.*, 1997 (20 MHz, CDCl_3 -piridina).

A análise dos dados espectrais de RMN de ^1H obtidos para L_4H foi realizada por comparação com os dados previamente relatados para o ácido benzoilgrandiflórico (FABBRI *et al.*, 1997). O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Tabela 25, Figura 16) revelou a presença de três sinais com integral correspondente a 5 H na região de aromáticos (δ_{H} 6,0 a

8,0 ppm), sinais na região característica de hidrogênios olefínicos (4,5 a 7,5 ppm) ou metínicos conjugados com éster [HC–OC(=O)Ph] e sinais sobrepostos na região característica de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos (δ_H 0,86 a 2,17 ppm). Nessa região, atribuiu-se o sinal em δ_H 0,99 (s, 3H) aos hidrogênios metílicos H20 e δ_H 1,20 ppm (s, 3H) aos hidrogênios do grupo metila H18. O simpleto largo centrado em δ_H 2,86, com integral de um hidrogênio, foi atribuído a H13.

O duplete centrado em δ_H 8,04 ppm (2H, $J_{3',4'}$ 8,0 Hz) foi atribuído aos hidrogênios H3', o multiplete no intervalo entre δ_H 7,42 a 7,46 ppm (2H, $J_{4',3'}$ 8,0 Hz) foi atribuído aos hidrogênios H4' e o multiplete δ_H 7,53 a 7,55 (1H) foi atribuído a H5'. Os simpletos largos em δ_H 5,12 e 5,18 ppm (2H) são característicos de hidrogênios olefínicos geminais, confirmando a presença de ligação dupla exocíclica, presente em alguns diterpenos caurânicos, sendo atribuídos a H17b e H17a, respectivamente. O simpleto largo em δ_H 5,52 ppm foi atribuído a H15.

Tabela 25. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H obtido para L₄H e comparação com dados relatados para o ácido benzoilgrandiflórico.

Hidrogênio	δ_H (ppm) [multiplicidade; integral]	
	L ₄ H ^a	Ác. benzoilgrandiflórico ^b (39)
13	2,85 (sl, 1H)	-
15	5,52 (sl, 1H)	5,52 (sl, 1H)
17 a	5,18 (sl, 1H)	5,18 ou 5,10 (sl, 1H)
17 b	5,12 (sl, 1H)	5,18 ou 5,10 (sl, 1H)
18	1,20 (s, 3H)	1,23 (s, 3H)
20	0,99 (s, 3H)	0,99 (s, 3H)
3'	8,04 (d, 2H, $J_{3',4'}$ 8,0 Hz)	
4'	7,42 a 7,46 (m, 2H, $J_{4',3'}$ 8,0 Hz)	8,2-7,3 (m, 5H)
5'	7,53 a 7,55 (m, 1H)	

Nota: ^aDados obtidos no presente trabalho (400 MHz, CDCl₃). ^bDados relatados por Fabbri *et al.*, 1997 (80 MHz, CDCl₃-piridina).

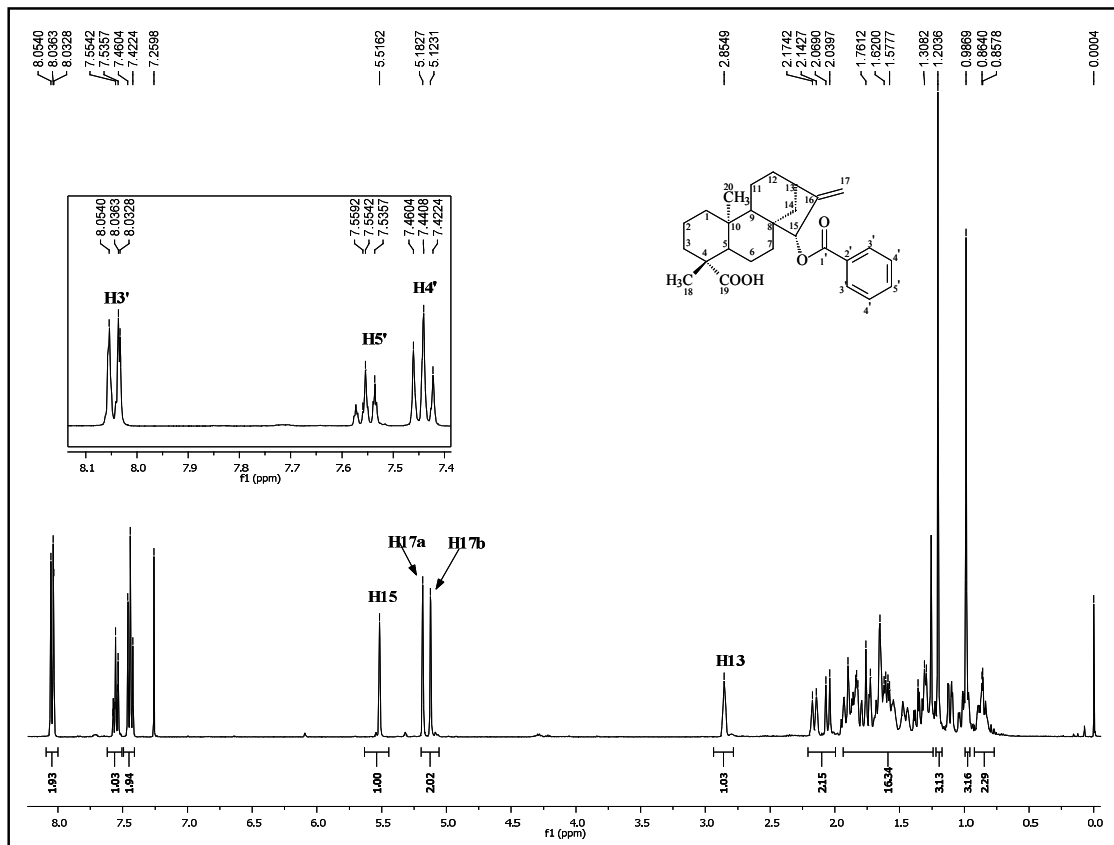


Figura 16. Espectro de RMN de ¹H obtido para L₄H (400 MHz, CDCl₃).

A configuração absoluta de diterpenos caurânicos pode ser estabelecida com base no valor da rotação óptica específica ($[\alpha]_D$) apresentada pela substância em análise, sendo o enantiômero levógiro classificado como da série dos *ent*-caurânicos (VELANDIA *et al.*, 1998). L₄H é o enantiômero levógiro, $[\alpha]_D^{24} = -40^\circ$ (MeOH, *c* 2,0 mg/mL) e, portanto, pertencente a série *ent*- dos derivados caurânicos.

Diante dos dados apresentados foi possível identificar L₄H como sendo o ácido benzoilgrandiflórico (**39**) [ácido *ent*-15β-benzoilóxicaur-16-en-19-óico].

5.2.4 LC₃ (ácido cinamoilgrandiflórico, **4**)

LC₃ (96,6 mg) foi obtido do fracionamento cromatográfico da fração L₃N de *M. laevigata* (item 4.8.5.6), em coluna aberta de sílica gel, empregando-se como eluente hexano: Et₂O (95:5). LC₃ apresentou-se como um sólido cristalino branco, com faixa de fusão entre 191 a 195°C. O cromatograma obtido por CLAE-DAD para LC₃, (Figura 17), apresentou um

pico majoritário com TR = 47,6 min, valor próximo àqueles dos picos referentes aos ácidos benzoilgrandiflórico (TR = 45,73) (item 5.2.3) e caurenóico (TR = 47,07 min) (item 5.2.5), sugerindo tratar-se de um derivado do ácido caurenóico.

O espectro no UV (Figura 17) obtido *on-line* para LC₃ apresentou bandas de absorção (216 nm, 223 nm e 277 nm) características de cromóforo cinamoila (NGUYEN *et al.*, 2005).

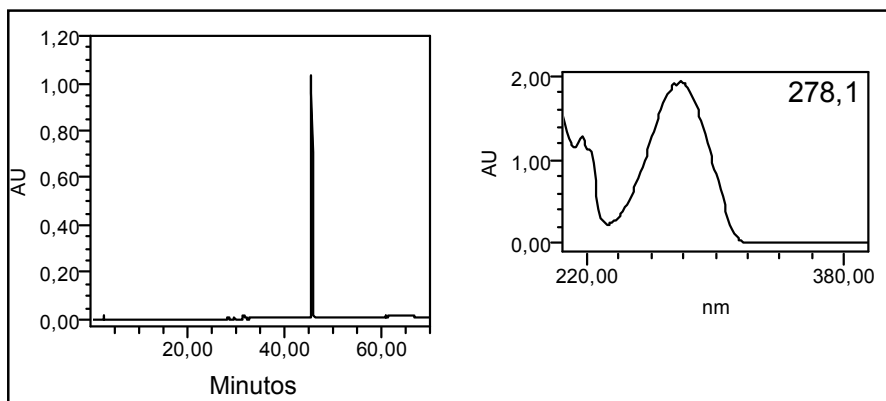


Figura 17. Cromatograma e espectro no UV obtido *on-line* por CLAE-FR para LC₃. **Condições cromatográficas:** vide Parte Experimental, item 4.8.3.2.

As bandas de absorção em 1637, 1578, 1469, 1449 cm^{-1} observadas no espectro de infravermelho de LC₃ indicam a presença de anel aromático, sendo a banda em 766 cm^{-1} indicativa da presença de anel aromático monossustituído. A banda centrada em 1688 cm^{-1} foi atribuída à estiramentos de carbonila de ácido carboxílico e, em 1716 cm^{-1} , à carbonila de éster α,β -insaturado (Figura 18). A banda de alta intensidade centrada em 1163 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação C–O de éster (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA *et al.*, 2001). A atribuição das demais bandas no espectro no IV de LC₃ estão apresentadas na Tabela 26 e são semelhantes àquelas descritas no presente trabalho para o ácido benzoilgrandiflórico (**39**) (item 5.2.3).

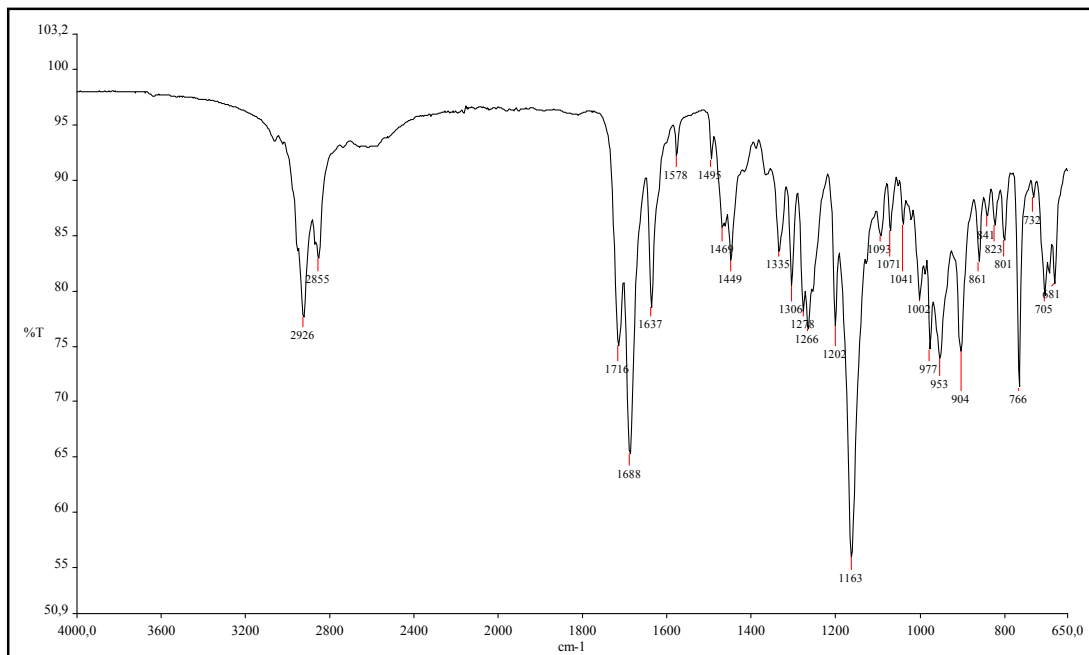


Figura 18. Espectro de absorção no infravermelho obtido para LC₃.

Tabela 26. Frequências de absorção e vibrações das bandas do espectro no IV obtido para LC₃.

Frequências de absorção (cm ⁻¹)	Vibração
3300-2400	Estiramento O-H de ácidos carboxílicos
3040	Estiramento =C-H de aromático e de alqueno <i>trans</i> -disubstituído
2926, 2855	Estiramento C-H de grupos metila e metilênico
1716	Estiramento C=O de éster aril
1688	Estiramento C=O de ácido carboxílico
1578, 1495, 1469 e 1449	Estiramento de C=C de aromático
1675 e 977	Deformação C-H de alqueno <i>trans</i> -disubstituído
1278 e 1266	Estiramento C-O de ácido carboxílico e de éster
1163	Estiramento C-O de ácido carboxílico e de éster
766	Deformação C-H de aromático monossubstituído

Os dados espectrais de RMN de ¹H e de ¹³C obtidos para LC₃ são semelhantes àqueles relatados para o ácido benzoilgrandiflórico (**39**) no presente trabalho (item 5.2.3) e assim, somente as diferenças observadas serão discutidas. No espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de LC₃ (Tabela 27, Figura 19) observaram-se sinais referentes a cinco hidrogênios aromáticos (δ_{H} 7,36-7,39 ppm, 3H, *m*, H7' e H6' e δ_{H} 7,53 ppm, 2H, *dd*, *J* 2,8 e 9,2 Hz, H5'), além de dois dupletos centrados em δ_{H} 7,69 e 6,47 ppm, com valor de acoplamento escalar (*J* = 16 Hz) característico de hidrogênios olefínicos *trans*-posicionados. Esses dados indicam a presença de substituinte *trans*-cinamoila em LC₃, sendo os sinais atribuídos a H3' e H2',

respectivamente. Essa atribuição está em conformidade com dados relatados para o ácido cinamoilgrandiflórico (**4**) (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2001), ácido *trans*-cinâmico (HANAI *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2004) e derivados contendo o grupo cinamoila (NGUYEN *et al.*, 2005; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2007).

Tabela 27. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H obtido para LC₃ e comparação com dados relatados para o ácido cinamoilgrandiflórico.

H	δ (ppm) [multiplicidade; integral; <i>J</i> (Hz)]		
	LC ₃ ^a	AC (4) ^b	At-C
13	2,83(sl, 1H)	2,82(sl, 1H)	
15	5,41 (sl, 1H)	5,41 (sl, 1H)	-
17 a	5,16 (sl, 1H)	5,20 ou 5,07 (sl, 1H)	-
17 b	5,12 (sl, 1H)	5,20 ou 5,07 (sl, 1H)	-
18	1,22 (s, 3H)	1,21 (s, 3H)	-
20	0,97 (s, 3H)	0,99 (s, 3H)	-
2'	6,47 (d, <i>J</i> = 16)	6,47 (d, <i>J</i> = 16)	6,47 (d, <i>J</i> = 16)
3'	7,69 (d) (d, <i>J</i> = 16)	7,69 (d) (d, <i>J</i> = 16)	7,81 (d, <i>J</i> = 16)
5'	7,53 (dd, 2H, , <i>J</i> = 2,8 e 9,2)	7,53 (m, 2H)	7,57 (m, 2H)
6' e 7'	7,36-7,39 (m, 3H)	7,38 (m,3H)	7,42 (m, 3H)

Notas: ^aDados obtidos no presente trabalho (400 MHz, CDCl₃). ^bDados relatados para AC (ácido cinamoilgrandiflórico) por Nascimento; Oliveira (2001) (300 MHz, CDCl₃) e Hanai *et al.*, 2001; e At-C (ácido *trans*-cinâmico-) por Liu *et al.*, 2004 (100 MHz, CDCl₃). H = hidrogênio.

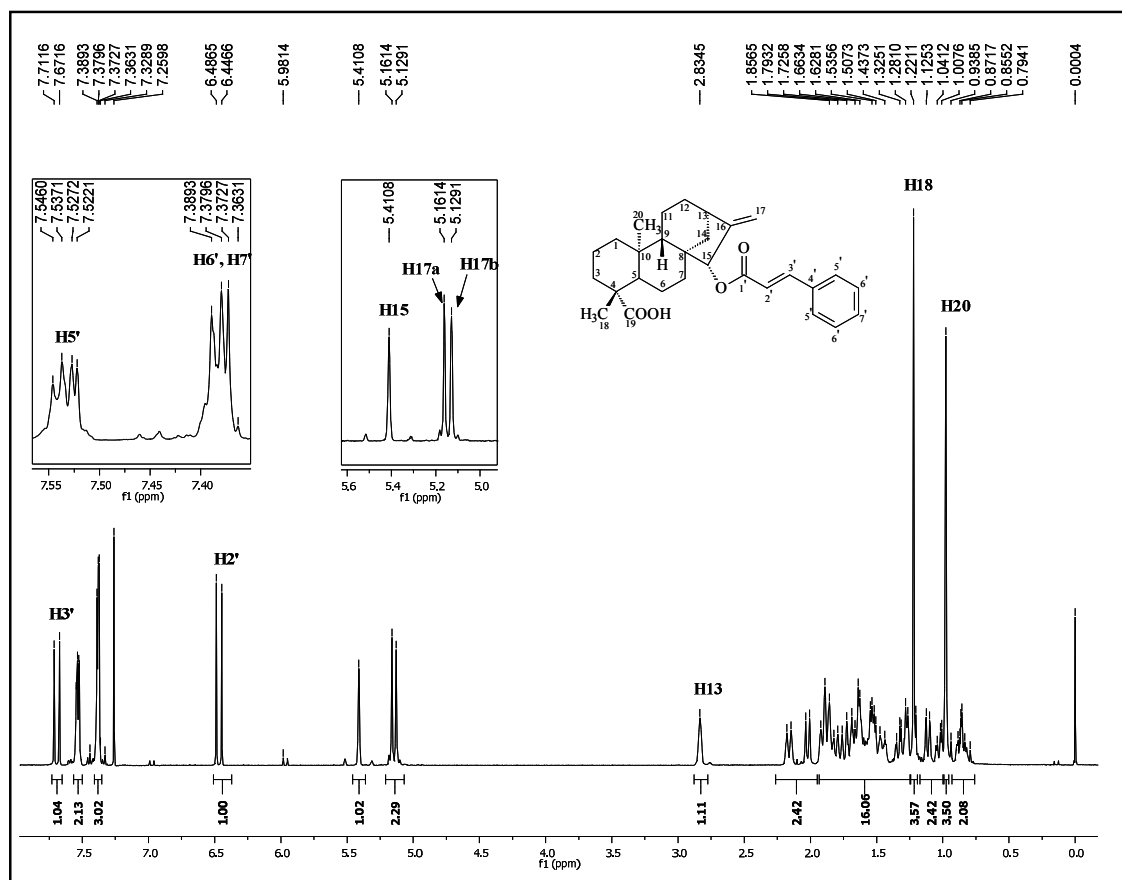


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H obtido para LC_3 (400 MHz, CDCl_3).

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (100 MHz, CDCl_3) obtido para LC_3 (Figura 20) apresentou sinais referentes a 29 carbonos, sendo a natureza desses deduzida pelo subspectro DEPT-135 (Figura 20) como dois carbonos metílicos, dez carbonos metilênicos, onze carbonos metínicos e seis carbonos não-hidrogenados. LC_3 apresentou, portanto, dois sinais referentes a carbonos metínicos (δ_{C} 118,70 e 145,04 ppm) a mais em relação a **38** (item 5.2.3). Esses dados são condizentes com derivado caurânico cinamoil-substituído.

Os sinais adicionais, observados para LC_3 , foram erroneamente atribuídos por Vicknewski *et al.* (1977) aos carbonos $\text{C}7'$ e $\text{C}3'$ do ácido cinamoilgrandiflórico. No entanto, Nascimento e Oliveira (2001) os atribuíram a $\text{C}2'$ e $\text{C}3'$, respectivamente. Esses dados corroboram os dados publicados para o ácido *trans*-cinâmico (**68**) e derivados *trans*-cinamoila (**69**) (HANAI *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2004; NGUYEN *et al.*, 2005; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2007). Apresentam-se, na Tabela 28, as atribuições dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para LC_3 , com destaque para a correção de algumas

atribuições anteriormente relatadas por Vicknewski *et al.* (1977) para o ácido cinamoilgrandiflorico.

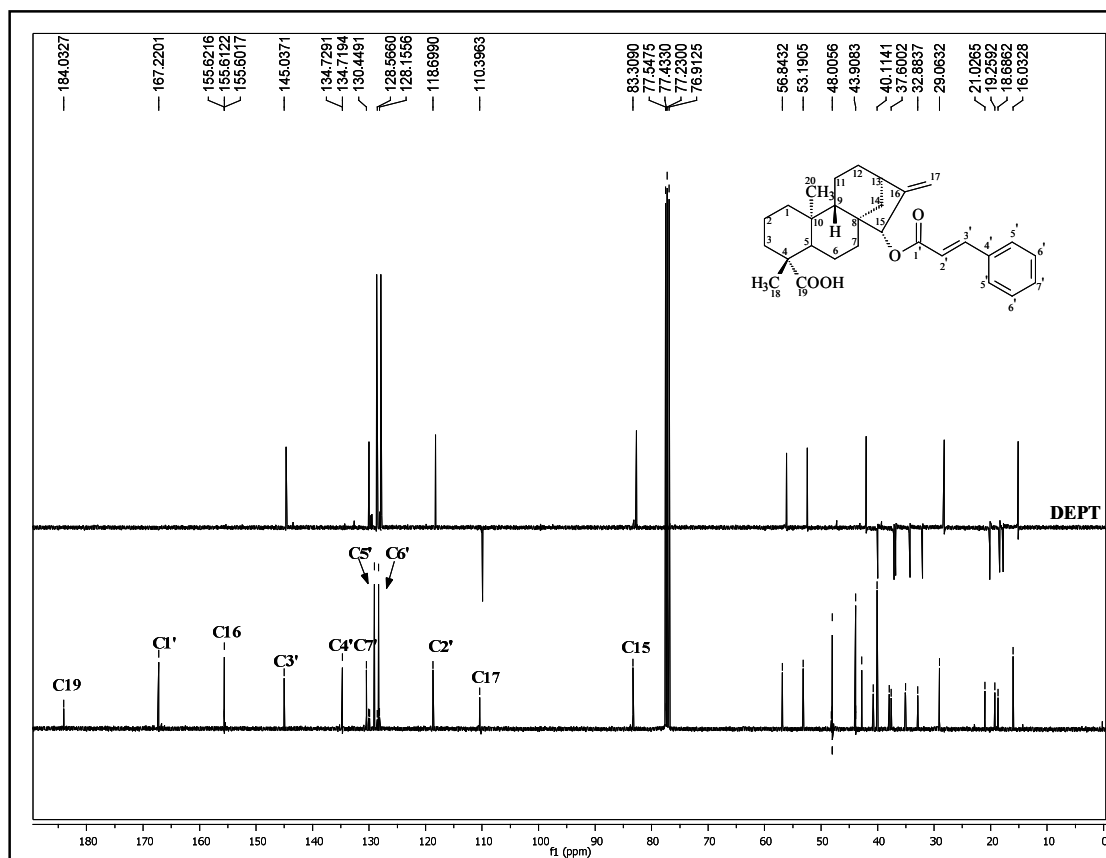


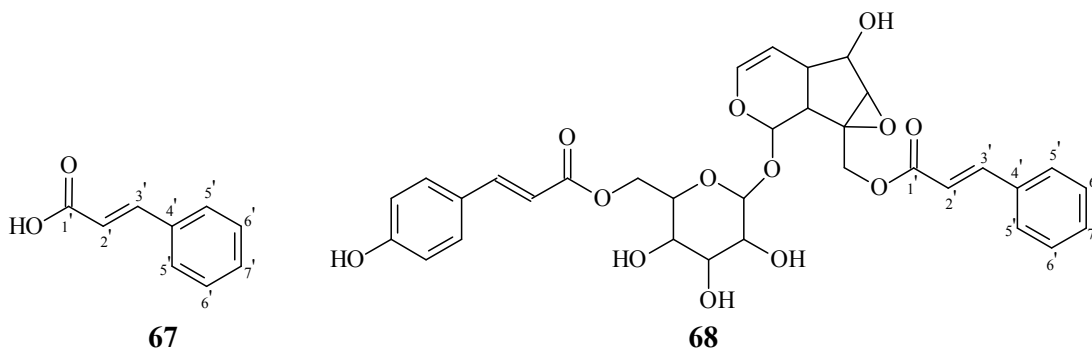
Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 obtidos para LC₃ (100 MHz, CDCl_3).

As atribuições dos sinais referentes a C2' e C3' foram confirmadas pela análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear (HMOC), onde foi possível observar mancha de correlação entre o sinais referentes a H2' (δ_{H} 6,47 ppm) e C2' (δ_{C} 118,70 ppm), bem como entre H3' (δ_{H} 7,69 ppm) e C3' (δ_{C} 145,04 ppm) (Figura 21).

Tabela 28. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para LC₃ e comparação com dados da literatura.

C	δ_{C} (ppm)					DEPT-135
	LC ₃ ^a	AC ^b (4)	AC ^c (4)	At-C ^d	Dt-C ^e	
1	40,79	40,7	40,7			CH ₂
2	18,65	18,5	18,5			CH ₂
3	37,92	37,8	37,8			CH ₂
4	43,88	43,8	43,8			C
5	56,84	56,7	56,7			CH
6	21,03	20,9	20,9			CH ₂
7	35,08	34,9	34,9			CH ₂
8	48,01	47,9	47,7			C
9	53,19	53,1	53,1			CH
10	40,11	40,0	40,0			CH ₂
11	19,26	19,1	19,1			CH ₂
12	32,68	32,7	32,7			CH ₂
13	42,81	42,7	42,7			CH
14	37,60	37,4	37,4			CH ₂
15	83,31	83,2	83,2			CH
16	155,62	155,4	155,4			C
17	110,40	110,1	110,1			CH ₂
18	29,06	28,9	28,9			CH ₃
19	184,03	166,9	184,2			C
20	15,82	15,9	15,9			CH ₃
1'	167,22	184,2	166,9	172,6	166,7	C
2'	118,70	130,1	118,6	117,3	119,0	CH
3'	145,04	144,7	144,7	147,1	145,5	CH
4'	134,72	134,6	134,6	134,0	131,1	C
5'	128,89	128,8	128,8	128,4	129,8	CH
6'	128,32	128,0	128,1	129,0	129,1	CH
7'	130,07	118,6	130,1	130,8	131,1	CH

Notas: ^aDados obtidos no presente trabalho (100 MHz, CDCl₃). Dados relatados por ^bVicknewski *et al.*, 1977 (67,5 MHz, CDCl₃); ^cNascimento; Oliveira (2001) (75 MHz, CDCl₃); ^dHanai *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004 (100 MHz, CDCl₃); ^eDomínguez *et al.*, (2007) (75MHz, CDCl₃). C = carbono; AC = ácido cinamoilgrandiflórico; At-C = ácido *trans*-cinâmico (ác. *E*-fenil-2-propenóico) (67); Dt-C = derivado *trans*-cinamoila (penesteminósídeo) (68).



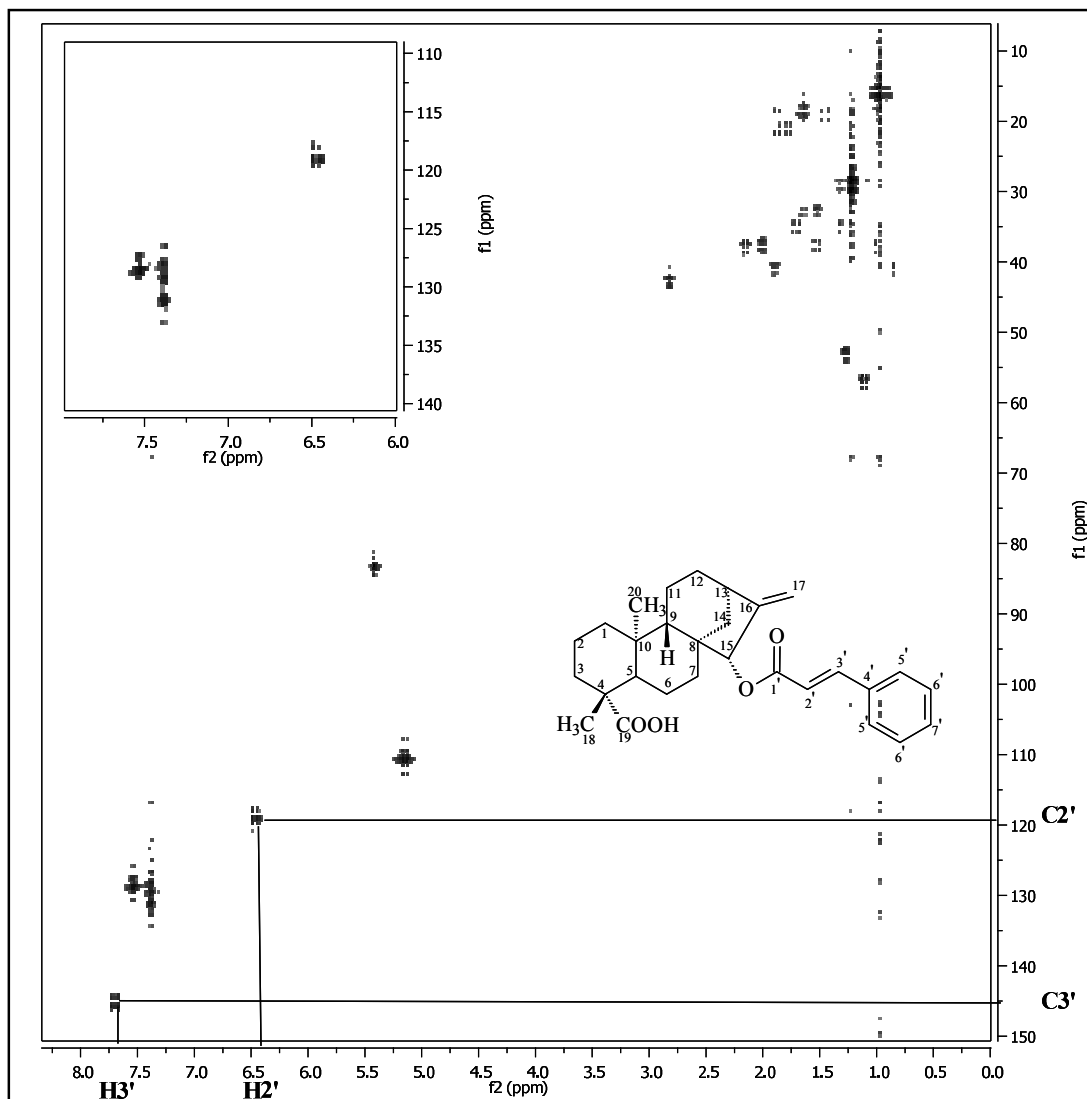


Figura 21. Mapa de contornos obtido para LC₃ pelo experimento HMQC (¹H, 400 MHz; ¹³C, 100 MHz, CDCl₃).

A determinação do valor de rotação ótica para LC₃ revelou ser este o enantiômero levógiro, com $[\alpha]_D^{24} = -40^\circ$ (metanol, *c* 2,0 mg/mL), portanto, pertencente à série *ent*- dos derivados caurânicos.

A análise dos dados espectrais de RMN de ¹H e de ¹³C obtidos para LC₃, em conjunto com a análise dos dados físico-químicos e comparação com os valores relatados na literatura (VICKNEWSKI *et al.* 1977; VELANDIA *et al.* 1998, NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2001; HANAI *et al.*, 2001; SILVA *et. al.*, 2001; LIU *et al.*, 2004; NGUYEN *et al.*, 2005; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2007) possibilitaram identificar LC₃ como sendo o ácido cinamoilgrandiflórico (**4**) [ácido *ent*-15β-cinamoilóxi-caur-16-en-19-óico].

5.2.5 LC e GC (ácido caurenóico, 2)

LC (7,8 mg), obtida da fração L₄F de *M. laevigata* (item 4.8.5.7), e GC (34,8 mg) oriunda da fração GC_{1A} de *M. glomerata* (item 4.8.6.2), foram purificadas por CLAE-FN em escala preparativa, empregando-se eluição isocrática de hexano: Et₂O (7:3) (item 4.8.4). LC e GC foram obtidos como sólidos amorfos incolores. A análise dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para esses sólidos e co-injeção de ácido caurenóico como substância de referência, sugeriu tratar-se do ácido caurenóico. Além disso, os espectros no ultravioleta obtidos *on-line* para esses sólidos foram idênticos ao do ácido caurenóico de referência, apresentando máximos de absorção em 205 nm (Figura 22).

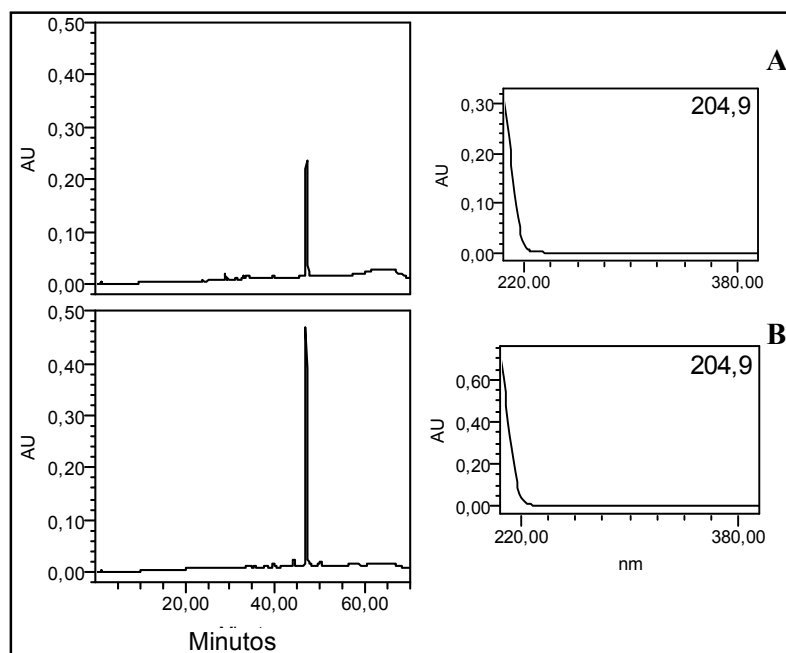


Figura 22. Cromatogramas e espectros no UV obtidos *on-line* por CLAE-FR para GC (A) e ácido caurenóico de referência (B). **Condições cromatográficas:** vide Parte Experimental, item 4.8.3.2.

Os dados espectroscópicos obtidos, isoladamente, para GC e LC foram idênticos e, portanto, sua discussão foi realizada apenas para GC. O espectro obtido no IV para GC (Figura 23) evidenciou a natureza alifática das substâncias, pela presença de absorções em 2927 e 2851 cm^{-1} , atribuídas às deformações axiais de C–H. A presença de uma banda larga de absorção na região de 3400-2400 cm^{-1} , característica de vibrações de deformação axial de O–H, a presença de uma banda intensa de absorção em 1691 cm^{-1} , característica de estiramento C=O de ácido carboxílico, e banda de intensidade média em 1260 cm^{-1} atribuída à

deformação axial de C—O, caracterizam a presença de grupo carboxila em GC. As bandas de absorção em 3095 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} e 871 cm^{-1} foram atribuídas a grupo vinila, indicando a presença de ligação dupla exocíclica, característica de alguns diterpenos caurenícos, incluindo o ácido caurenóico (**2**) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA *et al.*, 2001). As frequências de absorção e vibrações características das bandas de absorção no IV de GC estão em concordância com os dados relatados por Oliveira *et al.* (1984) para o ácido caurenóico (**2**) (Tabela 29).

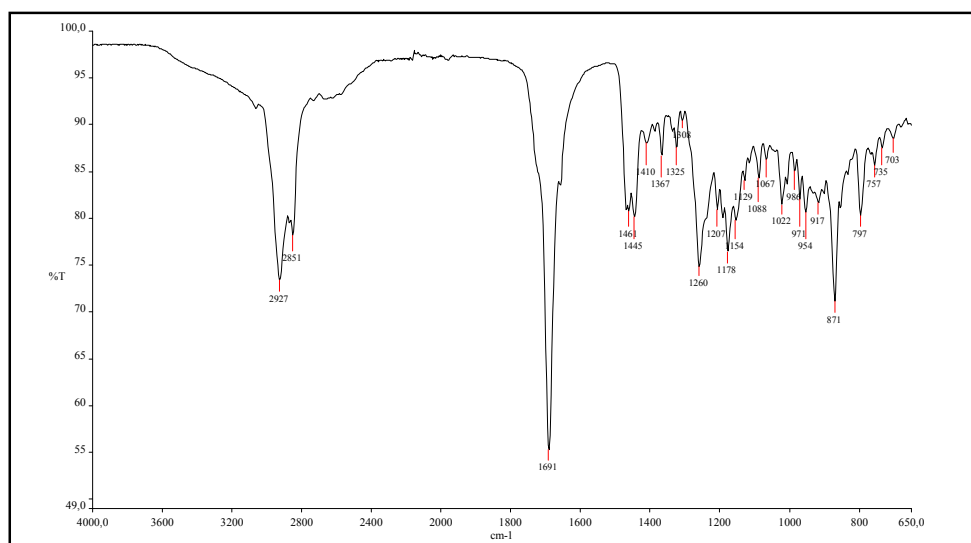


Figura 23. Espectro de absorção no infravermelho obtido para GC.

Tabela 29. Frequências de absorção e vibrações das bandas de GC do espectro no IV e comparação com dados relatados para o ácido caurenóico.

GC (cm^{-1}) ^a	ác. caurenóico (2) (cm^{-1}) ^b	Vibração
3400-2400	3100	Estiramento O-H de ácido carboxílicos
3095	-	Estiramento C-H de grupo vinila
2927, 2851	2924, 2847	Estiramento C-H de grupos metila e metileno
1691	1690	Estiramento C=O de ácido carboxílico
1660	1658	Estiramento de C=C não conjugada
1468 e 1444	1450	Deformação de -CH ₂ - alifático
1260	1250	Estiramento C-O de ácido carboxílico
871	870	Deformação de metileno terminal

Nota: ^aDados obtidos no presente trabalho por reflectância atenuada, sem emprego de diluição em brometo de potássio (KBr). ^bDados relatados por Oliveira *et al.* (1984) (KBr, ν_{max}).

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (100 MHz, CDCl_3) obtidos para GC (Figura 24, Tabela 30) apresentou sinais referentes a 20 átomos de carbono, característico de esqueleto carbônico de diterpenos (BASER *et al.*, 1996; OHKOSHI, *et al.*, 2004; BATISTA,

2005; BATISTA *et al.*, 2005). A natureza dos carbonos foi deduzida pelo subespectro DEPT-135 (Figura 24) e indicou a presença de dois carbonos metílicos, dez metilênicos, três metínicos e cinco carbonos não-hidrogenados.

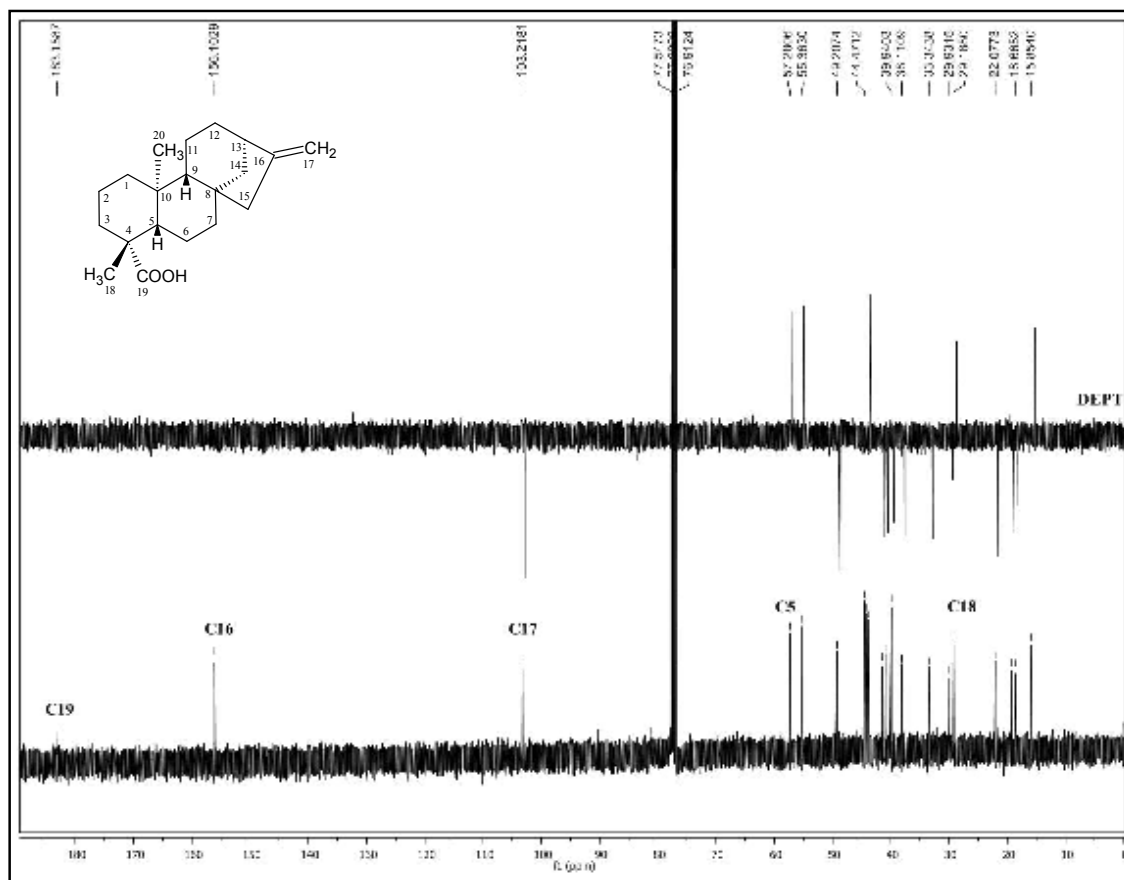


Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 obtidos para GC (100 MHz, CDCl_3).

Os sinais em δ_{C} 103,22 e 156,10 ppm foram atribuídos aos carbonos metilênicos C17 e C16, respectivamente (BATISTA, 2005; BATISTA *et al.*, 2005). O sinal em δ_{C} 183,16 ppm foi atribuído à carbonila carboxílica C19, confirmando os dados do espectro no infravermelho. A localização *trans*-axial entre o grupo carboxila e o hidrogênio H5 foi definida com base no valor de deslocamento químico de C5 (δ_{C} 57,28 ppm). No caso de posicionamento *cis*-equatorial entre a carboxila e H5, C5 apresenta valor de deslocamento químico de aproximadamente δ_{C} 50,0 ppm, devido ao efeito γ dos átomos de oxigênio da carboxila (VELANDIA *et al.*, 1998). As demais atribuições foram realizadas por comparação com os dados previamente relatados para o ácido caurenóico (**2**) e estão apresentadas na Tabela 30 (VELANDIA *et al.*, 1998; BATISTA, 2005; BATISTA *et al.*, 2005).

Tabela 30. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para GC e comparação com dados relatados para o ácido caurenóico.

Carbono	δ_{C} (ppm)			DEPT-135
	GC ^a	Ác. caurenóico ^b (2)	Ácido caurenóico ^c (2)	
1	40,95	40,7	-	CH ₂
2	19,34	19,1	-	CH ₂
3	38,11	37,8	-	CH ₂
4	43,92	43,8	-	C
5	57,28	57,1	57,2 para C-19 ax <i>trans</i> à H-5	CH
6	22,08	21,8	-	CH ₂
7	41,52	41,3	-	CH ₂
8	44,09	44,2	-	C
9	55,36	55,1	-	CH
10	39,94	39,7	-	C
11	18,67	18,4	-	CH ₂
12	33,34	33,1	-	CH ₂
13	44,47	43,9	-	CH
14	39,90	39,7	-	CH ₂
15	49,21	49,0	-	CH ₂
16	156,10	156,0	-	C
17	103,22	103,1	-	CH ₂
18	29,18	29,0	29,0 para C-19 ax <i>trans</i> à H-5	CH ₃
19	183,16	184,5	185,0	C
20	15,85	15,6	15,6 para C-19 ax <i>trans</i> à H-5	CH ₃

^aDados obtidos no presente trabalho (100 MHz, CDCl₃). Valores relatados por ^bBatista, 2005 e Batista *et al.*, 2005 (100 MHz, CDCl₃) e ^cVelandia *et al.*, 1998.

A análise dos dados espectrais de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl₃) obtidos para GC possibilitou confirmar sua identificação como ácido caurenóico. Como esperado, não foram observados sinais na região de deslocamento químico de hidrogênios aromáticos (δ_{H} 6,0 a 8,0 ppm) (Figura 25). Observa-se a presença de um multipletto e dois simpletos largos na região característica de hidrogênios olefínicos (δ_{H} 4,0 a 5,5 ppm) e diversos sinais sobrepostos na região de hidrogênios metílicos, metínicos e metilênico (δ_{H} 0,85 a 2,19 ppm) (Figura 25). Esse perfil espectral é compatível com substância de natureza diterpênica, corroborando a

atribuição realizada para o espectro de RMN de ^{13}C (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2001; BATISTA, 2005; BATISTA *et al.*, 2005).

Os sinais em δ_{H} 0,95 (s, 3H) e δ_{H} 1,24 ppm (s) foram atribuídos aos grupos metila H20 e H18, respectivamente. Os dois simpletos largos em δ_{H} 4,74 e 4,80 ppm foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-17b e H-17a, respectivamente, confirmando o observado no espectro de IV. As demais atribuições dos sinais do espectro de RMN de ^1H foram realizadas por comparação com os dados espectrais relatados para o ácido caurenóico e estão apresentadas na Tabela 31.

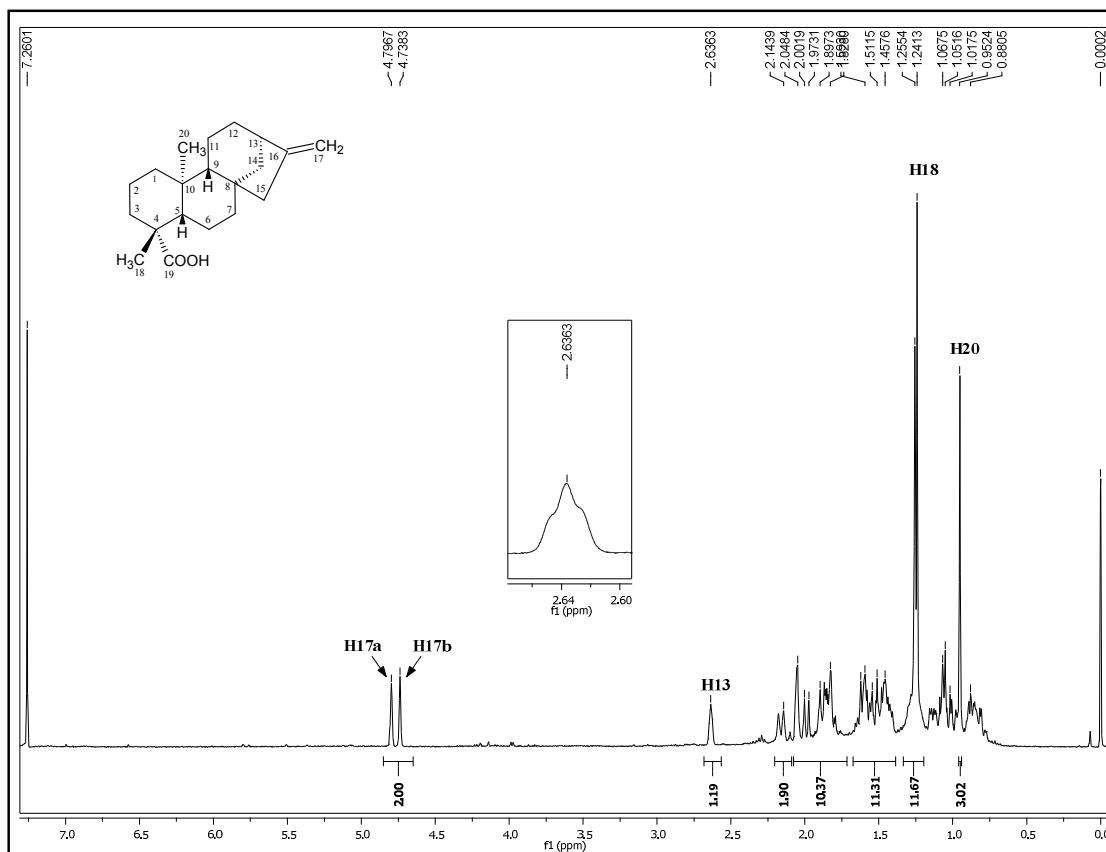


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H obtido para GC (400MHz, CDCl_3).

GC foi caracterizado como sendo o enantiômero levógiro a partir do valor de rotação ótica $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -100^\circ$ (MeOH, c 2,0 mg/mL), valor similar ao anteriormente descrito para o ácido *ent*-caur-16-en-19-óico, $[\alpha]_{\text{D}} = -104^\circ$ (MeOH, c 1,0 mg/mL) (NA *et al.*, 2006).

Tabela 31. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H obtido para GC e comparação com dados relatados para o ácido caurenóico.

Hidrogênio	δ_{H} (ppm) [multiplicidade; integral]	
	GC ^a	Ác. caurenóico ^b
13	2,63 (m, 1H)	2,64 (m, 1H)
17 a	4,74 (sl, 1H)	4,73 (sl, 1H)
17 b	4,80 (sl, 1H)	4,79 (sl, 1H)
18	1,24 (s)	1,24 (s, 3H)
20	0,95 (s, 3H)	0,95 (s, 3H)

Nota: ^aDados obtidos no presente trabalho (400 MHz, CDCl_3). ^bDados relatados por Batista, 2005 e Batista *et al.*, 2005 (200 MHz, CDCl_3).

A partir da análise dos dados espectrais e físico-químicos obtidos para CG e LC e comparação com valores relatados para diterpenos *ent*-caurânicos (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2001; BATISTA, 2005; BATISTA *et al.*, 2005; NA *et al.* 2006) foi possível caracterizar GC como sendo o ácido caurenóico, **2**, (ácido *ent*-caur-16-en-19-óico).

5.2.6 Isolamento de derivados do ácido cinâmico de *M. glomerata*

O perfil cromatográfico obtido por CLAE-FR para o extrato etanólico bruto G₁ de *M. glomerata* (item 5.1.1) não indicou a presença de cumarina e ácido *o*-cumárico. No entanto, apresentou dois picos majoritários com TR = 12,7 e 13,6 min (Figura 26).

A partição do extrato com EtOAc forneceu a fração G_{1B} (item 4.8.6.1), cujo cromatograma obtido por CLAE-FR também apresentou a presença majoritária desses picos (Figura 26).

A comparação dos tempos de retenção e dos espectros no UV do pico majoritário de G_{1B} (12,7 min) com ácidos cinâmicos de referência (ácidos *o*-cumárico, *p*-cumárico, caféico, ferúlico, *iso*-ferúlico e clorogênico) indicou tratar-se do ácido *iso*-ferúlico (RT=12,1 min) (Figuras 27), confirmado pela adição dessa substância ao extrato, observando-se o aumento da área do pico correspondente (dado não mostrado).

Visando isolar outros constituintes de *M. glomerata*, que poderiam vir a constituir marcadores químicos para a espécie, a fração G_{1B} foi submetida a cromatografia em coluna aberta de sílica gel (item 4.8.6.3), resultando na obtenção da fração CIN4, enriquecida na substância com TR = 12,2 min (Figura 28). Análises por CCD de sílica gel de CIN4, utilizando EtO₂:tolueno 1:1 acidificado como eluente, evidenciaram a presença de uma banda

com fluorescência verde-azulada intensa, após revelação com NP/PEG sob luz ultravioleta em 365 nm, e valor de R_f semelhante aos ácidos ferúlico e *iso*-ferúlico.

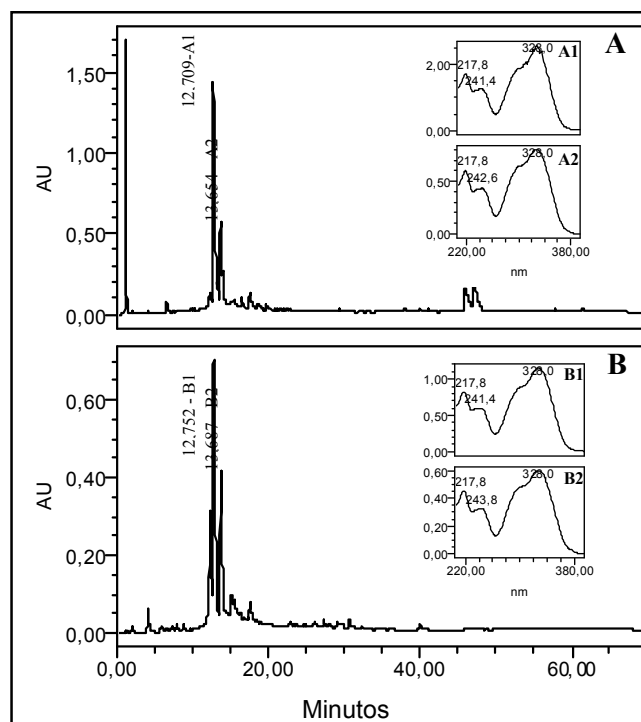


Figura 26. Cromatogramas e espectros no UV obtidos *on-line* por CLAE-DAD para G_1 (A) e G_{1B} (B). **Condições cromatográficas:** vide Parte Experimental, item 4.8.3.2.

A fração CIN4 foi submetida à purificação por CLAE em escala preparativa, utilizando coluna de ODS e gradiente de MeOH-H₂O (25 a 48%), sem sucesso. A instabilidade dos derivados cinâmicos, principalmente a fotoisomerização e termolabilidade em temperaturas superiores a 30 °C (BRUNETON, 1995), podem ter contribuído para o insucesso da purificação. Essa hipótese é respaldada pelas análises por CCD de sílica gel das frações oriundas de CIN4, nas quais inicialmente observaram-se bandas de coloração verde-azulada com fluorescência intensa, que desapareceram em análises posteriores.

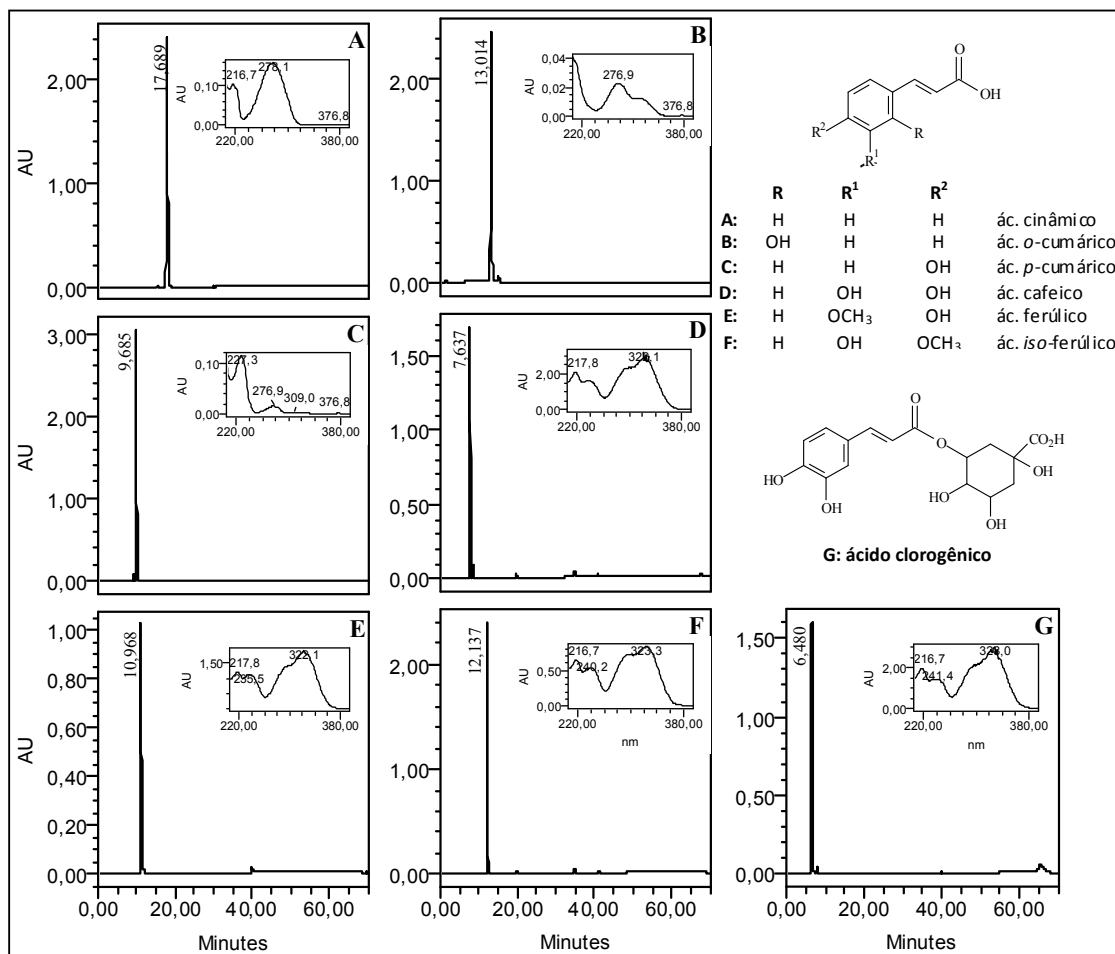


Figura 27. Cromatogramas e espectros no UV obtidos *on-line* por CLAE-DAD para ácidos cinâmicos de referência. **Condições cromatográficas:** vide Parte Experimental, item 4.8.3.2.

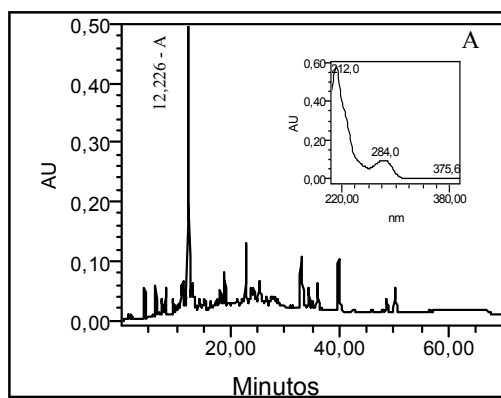


Figura 28. Cromatograma e espectro no UV obtido *on-line* por CLAE-DAD para CIN4. **Condições cromatográficas:** vide Parte Experimental, item 4.8.3.2.

Adicionalmente, a comparação dos espectros no ultravioleta, obtidos *on-line*, dos picos majoritários de G_{1B} (Figura 26B) e de CIN4 (Figura 28) sugere a isomerização da dupla ligação da cadeia lateral desse derivado cinâmico. As bandas em aproximadamente 300,0 e 328,0 nm presentes no espectro do pico majoritário de G_{1B} desapareceram no espectro do pico majoritário de CIN4. O espectro no UV dos ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados apresentam quatro bandas de absorções, designadas B1, B2₁, B2₃ e B3, sendo a banda B2₃ correspondente a ligação dupla C=C da cadeia lateral (BENGOECHEA *et al.*, 1995). A isomerização *cis-trans* desse cromóforo, geralmente leva o isômero *cis* a baixos valores de λ_{\max} e ϵ (SCOTT, 1964). Um exemplo disso, é o próprio ácido *trans*-cinâmico, cujo λ_{\max} de absorção ocorre em aproximadamente 273 nm ($\epsilon = 21.000$), enquanto que o ácido *cis*-cinâmico ocorre em cerca de 264 nm ($\epsilon = 9.500$) (SCOTT, 1964).

4.3 DEFINIÇÃO DOS MARCADORES QUÍMICOS

A ANVISA e a literatura da área definem marcador como um ou múltiplos constituintes (ou classe de constituintes) presentes na matéria-prima vegetal e que, preferencialmente, tenham correlação com o efeito terapêutico, sendo esses utilizados como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e padronização dos fitoterápicos (LAZAROWYCH; PEKOS, 1998; CARDELLINA, 2002; BRASIL, 2004).

Seguindo essa concepção, a literatura descreve a cumarina (**33**) como o principal marcador químico das espécies *M. laevigata* e *M. glomerata* (CELEGHINI *et al.*, 1999; CABRAL *et al.*, 2001; CELEGHINI *et al.*, 2001; BIAVATTI *et al.*, 2004; DUTRA, 2005; F.BRAS. IV, 2005).

Em conformidade com a literatura, nos materiais de guacos trabalhados no presente estudo foi possível isolar e caracterizar **33**, como marcador, apenas nas amostras de *M. laevigata*. O ácido *o*-cumárico (**42**) também foi definido como marcador químico de *M. laevigata* com base em dados previamente relatados na literatura (F.BRAS IV, 2005; SANTOS *et al.*, 2006), bem como por análises de CLAE-FR dos extratos etanólicos brutos dessa espécie e co-injeção com substância de referência, além da comparação dos espectros no UV, obtidos *on-line* a 210 nm.

Tentativas de isolamento de derivados cinâmicos majoritários dos extratos de *M. glomerata* (Figura 5; item 5.1) foram realizados, o que permitiria sua definição, como marcadores químicos, conforme discutido no item 5.2.5. Entretanto, um dos requisitos para

que uma substância seja definida como marcador químico de uma espécie vegetal é que ela seja estável quimicamente nas etapas associadas ao crescimento no campo, secagem, processamento e estocagem da droga vegetal e dos fitoterápicos (LAZAROWYCH; PEKOS, 1998). Porém, derivados cinâmicos presentes nos extratos de *M. glomerata* não preencheram esse requisito, uma vez que durante o isolamento sofreram degradação química.

Seguindo a linha de raciocínio para definição de marcador químico, sabe-se que a bioatividade das espécies vegetais está ligada ao sinergismo entre diversos compostos, sendo que esse efeito é negligenciado quando apenas um marcador é analisado. Derivados caurânicos presentes em ambas as espécies têm sido apontados como responsáveis, ao menos em parte, pelos efeitos terapêuticos dos guacos (CUNHA *et al.*, 2001; TIRAPELLI *et al.*, 2002; BIAVATTI *et al.*, 2004; AMBROSIO *et al.*, 2006). Por esse motivo, também foram definidos como marcadores químicos de ambas as espécies de guaco trabalhadas.

Porém, para a definição de uma substância como marcador químico, também deve-se considerar sua facilidade de obtenção. Cumarina (**33**) e ácido *o*-cumárico (**42**) são disponíveis comercialmente, já os diterpenos caurânicos [ácidos caurenóico (**2**), benzoilgrandiflórico (**39**) e cinamoilgrandiflórico (**4**)] não. Entretanto, dentre os derivados caurânicos, ao menos o ácido caurenóico pode ser obtido de fonte alternativas, uma vez que ocorre em abundância em sementes de *Xylopiia frutescens*, nas quais o teor é de 3,16% p/p ou ainda a partir das partes aéreas de *Wedelia paludosa* cujo teor é de 0,85% p/p (MELO *et al.*, 2001; BATISTA *et al.*, 2005).

Diante do exposto, foi possível definir, para *M. laevigata*, cinco marcadores químicos, dentre eles os derivados cinâmicos, **33** e **42**, e os diterpenos caurânicos (**2**, **39** e **4**). Para *M. glomerata*, definiram-se como marcadores químicos apenas os três diterpenos caurânicos.

5.4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE CLAE-DAD PARA QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS EM *M. laevigata* E *M. glomerata*

5.4.1 *M. laevigata*

O desenvolvimento do método de quantificação de marcadores químicos nas espécies de *Mikania* selecionadas para este estudo teve início com *M. laevigata* devido à maior complexidade de seu perfil cromatográfico. O método de desenvolvimento foi realizado com

amostras fortificadas com 0,1 mg/mL de ácido *o*-cumárico, considerando a baixa intensidade do pico desse constituinte, observada na corrida exploratória (Figura 29 condição A₁).

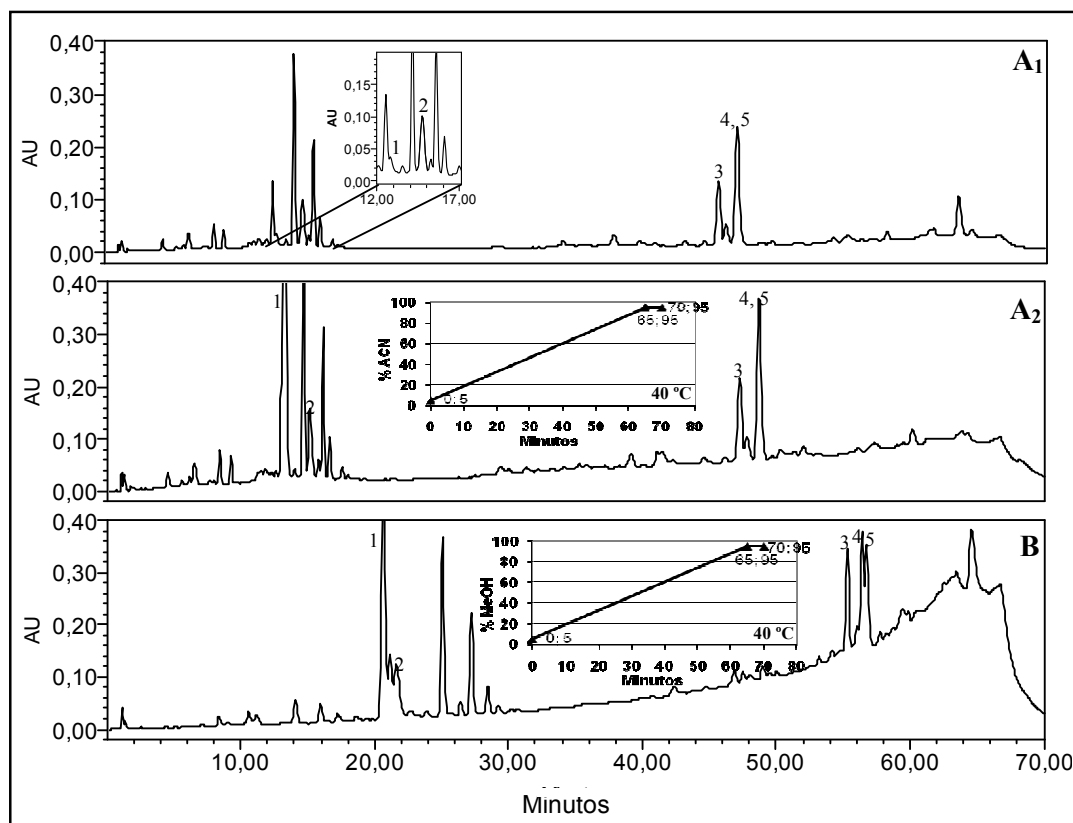


Figura 29. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para folhas de *Mikania laevigata* durante corridas exploratórias empregando ACN (A₁ e A₂) e MeOH (B) como modificadores orgânicos. A₁: amostra não fortificada, A₂ e B: amostras fortificadas com 0,01 mg/mL de ácido *o*-cumárico. **Condições cromatográficas:** vide condições cromatográficas A e B na Tabela 10, item 4.9.3.3 ou nos gráficos inseridos nos cromatogramas de maneira simplificada. (Inserção) Ampliação da seção do cromatograma obtido para *Mikania laevigata*. **Picos:** 1, ácido *o*-cumárico; 2, cumarina; 3, ácido benzoilgrandiflórico; 4, ácido cinamoilgrandiflórico; 5, ácido caurenóico.

Durante o desenvolvimento do método, além da atenção com a resolução adequada das substâncias de interesse ($R_s > 1,5$), a seletividade de cada condição foi avaliada pela pureza espectral dos picos no UV, obtidos *on-line* a 210 nm.

ACN e MeOH foram inicialmente avaliados como modificadores orgânicos, empregando-se gradiente linear de 5% a 95% do modificador em 65 min, temperatura de 40 °C e fluxo de 1,0 mL/min (Figura 29, condições A₂ e B). ACN, embora não tenha apresentado melhor separação que o metanol, como esperado resultou em picos com menores tempos de

retenção e menor flutuação de linha de base e, por isso, à princípio foi selecionado para o desenvolvimento do método. Isopropanol e tetrahidrofurano não foram avaliados como modificadores orgânicos porque apresentam valores de *cut-off* acima do comprimento de onda selecionado para a detecção (210 nm).

Como já mencionado, o desenvolvimento da condição cromatográfica foi realizado visando obter resolução adequada ($R_s > 1,5$) para análise quantitativa dos marcadores químicos, além de menor tempo de análise. Por isso, inicialmente tentou-se melhorar a resolução entre o ácido *o*-cumárico e a cumarina e reduzir o tempo de análise dos derivados caurânicos, desde que, no intervalo entre 20-45 min, nenhum pico de interesse analítico foi eluído.

Para isso, a inclinação do gradiente foi aumentada pela redução no tempo de eluição para 30 min e a temperatura fixada em 30 °C. O perfil cromatográfico resultante (Figura 30, condição C) foi similar aquele da corrida exploratória, com melhoria da resolução dos picos correspondentes aos diterpenos caurânicos, e tempos de retenção abaixo de 30 min.

A fim de melhorar a resolução dos picos da parte inicial do cromatograma (até 15 min), correspondente à eluição dos derivados cinâmicos, a temperatura foi reduzida para 25 °C, como previamente relatado para análises de ácidos fenólicos e hidroxicinâmicos (WEN *et al.*, 2005). De fato, pequena melhora na resolução foi observada entre o ácido *o*-cumárico e o pico vizinho co-eluído (Figura 30 condição D). Portanto, essa temperatura foi selecionada para as condições cromatográficas subsequentes.

A substituição do modificador orgânico sem alterar sua força é uma ferramenta poderosa para melhorar a seletividade cromatográfica (SNYDER *et al.*, 1997). A corrida exploratória inicial com MeOH sugeriu melhor resolução dos derivados do ácido cinâmico em relação aqueles eluídos com ACN (Figura 29, condição B). Por essa razão, a porcentagem inicial de 15% de MeOH foi avaliada na condição E, resultando em melhora na separação entre os picos do ácido *o*-cumárico e cumarina ($R_s = 1,42$), cujo par crítico apresentou resolução próxima a aceitável ($R_s = 1,50$). Vale a pena destacar, ainda, que os modificadores orgânicos apresentaram seletividade marcante para a cumarina, alterando a seqüência de eluição da sua banda em relação a outros derivados do ácido cinâmico (Figura 30 condição E).

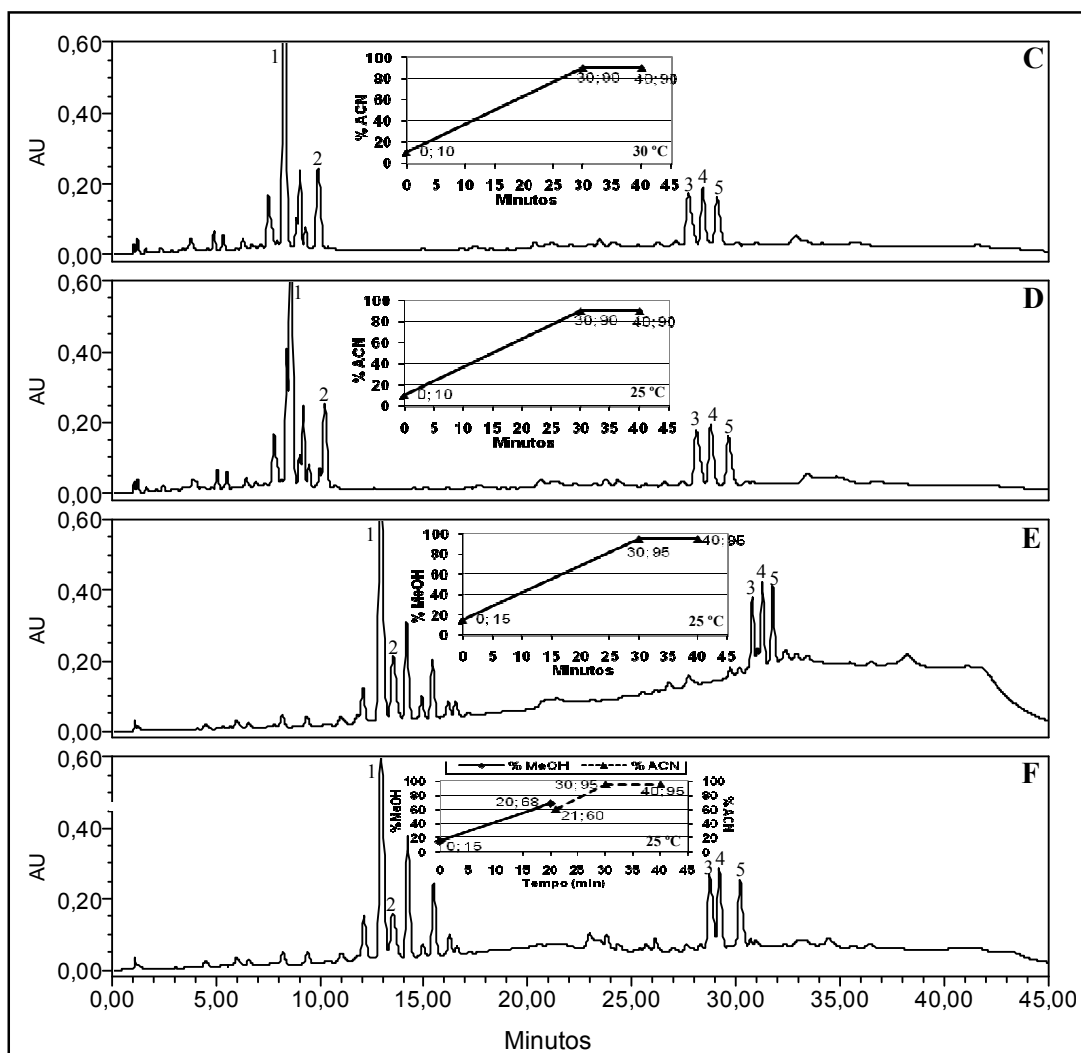


Figura 30. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para folhas de *Mikania laevigata* durante o desenvolvimento do método. Vide condições cromatográficas C-F na Tabela 10 item 4.9.3.3 ou nos gráficos inseridos nos cromatogramas de maneira simplificada. Os picos dos marcadores químicos identificados não apresentam pureza espectral, com exceção de 1 e 2 nas condições cromatográficas E. **Picos:** 1, ácido *o*-cumárico; 2, cumarina; 3, ácido benzoilgrandiflórico; 4, ácido cinamoilgrandiflórico; 5, ácido caurenóico.

Como esperado, o cromatograma obtido na condição E apresentou marcante flutuação na linha de base após 20 min de eluição, devido ao aumento no conteúdo de MeOH, resultante da proximidade entre o valor de *cut-off* desse modificador orgânico (205 nm) e o comprimento de onda estabelecido para a detecção do perfil cromatográfico (210 nm). Para minimizar esse problema, a eluição alternada de MeOH e ACN foi avaliada na condição F. Nessa condição, o gradiente de MeOH foi empregado até 20 min, sendo modificado para ACN após esse tempo, utilizando-se porcentagem do modificador com força equivalente de

eluição (Figura 30 condição F). No entanto, nenhuma banda correspondente aos marcadores químicos apareceram nos primeiros 10 min de eluição e a resolução entre os picos do ácido *o*-cumárico e da cumarina foi inadequada ($R_s < 1,5$).

A redução no tempo de análise foi introduzida na condição G, pelo aumento na força do eluente, iniciando-se a eluição com gradiente linear de 37-50% de MeOH em 15 min, seguido por gradiente linear de 40-90% de ACN (Tabela 10, item 4.9.3.3). Essa condição diminuiu o tempo de eluição em aproximadamente 7 min, mas o pico correspondente à cumarina eluiu parcialmente sobreposto ao seu pico vizinho (Figura 31 condição G). No entanto, um ajuste fino na proporção do modificador orgânico para 34% de MeOH resultou em $R_s = 1,88$ entre os picos do ácido *o*-cumárico e cumarina, os quais exibiram pureza espectral nas análises por DAD (Figura 31 condição H). Não foi observada melhora adicional na resolução destes picos pela redução do fluxo de 1,0 mL/min para 0,9 mL/min (Figura 31 condição I). Ressalta-se, no entanto, que o cromatograma na condição H, ainda exibiu um intervalo, entre aproximadamente 15 a 30 min, sem eluição de picos de interesse analítico, ao lado de uma pequena flutuação na linha de base na região correspondente aos picos dos diterpenos caurânicos, atribuída à inclinação acentuada do gradiente de eluição.

Dessa forma, para reduzir o espaço ocioso foi introduzido, no intervalo de 16 a 20 min uma elevação abrupta da força do metanol de 40 para 65%. Esse aumento correspondeu a 6,25 %/min, o qual foi em seguida reduzido para 1,0%/min no intervalo de 20 a 35 min (condição J). Como resultado dessa modificação, a flutuação na linha de base desapareceu, entretanto, os picos dos diterpenos caurânicos permaneceram com resolução inadequada para análises quantitativas ($R_s < 1,5$) (Figura 32 condição J). A inclinação do gradiente foi, então, sequencialmente suavizada após 20 min de 1,0%/min de ACN (condição J) para 0,75 (condição K), 0,65 (condição L) e 0,60 %/min (condição M). Com o emprego dessas alterações, observou-se aumento gradual na resolução ao longo da série, porém com concomitante alargamento dos picos dos diterpenos caurânicos, somados à sobreposição parcial dos picos dos ácidos benzoilgrandiflórico e cinamoilgrandiflórico aos picos vizinhos, em todas as condições ensaiadas (Figura 32 condições K, L e M).

A nova condição estabelecida (condição N) possibilitou a eluição dos cinco marcadores químicos nas folhas de *M. laevigata* com resolução satisfatória para análise quantitativa ($R > 1,5$), no intervalo de 38 min de corrida (Figura 33).

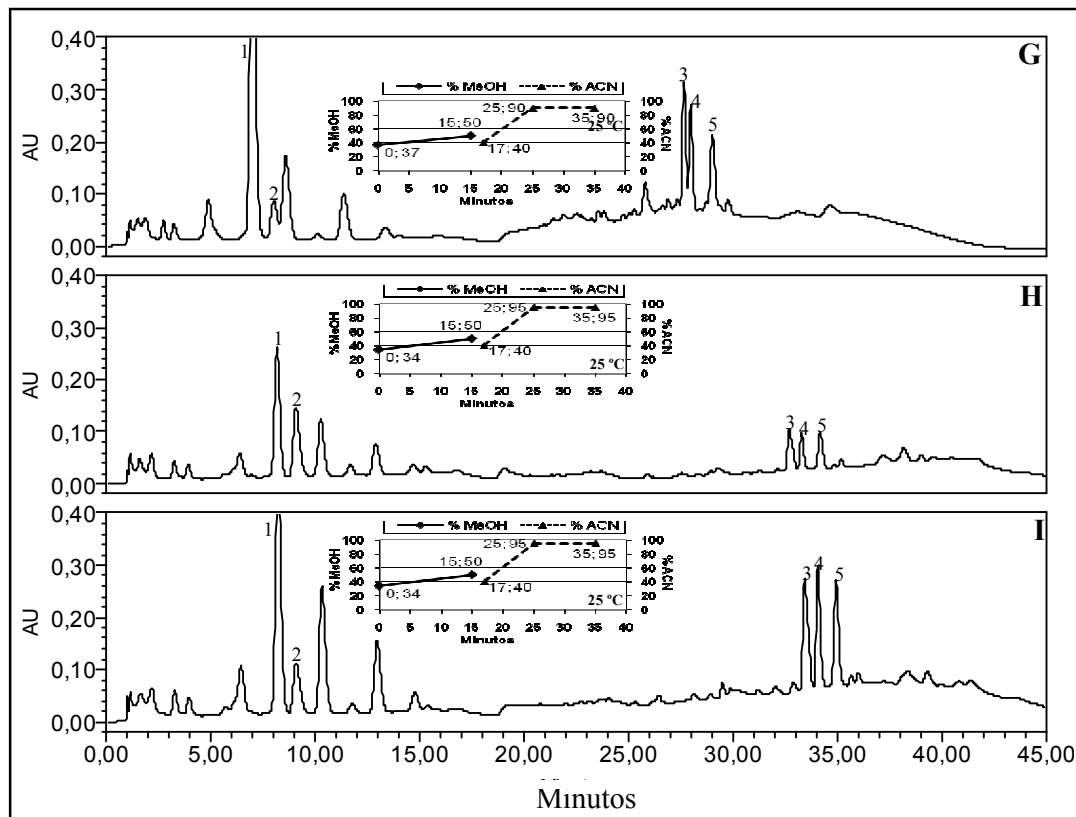


Figura 31. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para folhas de *Mikania laevigata* durante o desenvolvimento do método. Vide condições cromatográficas G-I na Tabela 10 item 4.9.3.3 ou nos gráficos inseridos nos cromatogramas de maneira simplificada. **Picos:** 1, ácido *o*-cumárico; 2, cumarina; 3, ácido benzoilgrandiflórico; 4, ácido cinamoilgrandiflórico; 5, ácido caurenóico.

A partir desses resultados, selecionou-se a condição K para modificações adicionais. Espectros no UV registrados *on-line* no DAD para os ácidos benzoilgrandiflórico e cinamoilgrandiflórico indicaram máximos de absorções nos comprimentos de onda de 230 nm e 270 nm, respectivamente, enquanto as substâncias não identificadas, correspondentes aos picos vizinhos, apresentaram λ_{\max} de 210 nm.

Tendo em vista que todas as tentativas prévias para melhorar a resolução dos derivados caurânicos falharam, utilizou-se como estratégia a detecção dos marcadores químicos em diferentes comprimentos de onda, 210 nm para a cumarina e ácidos *o*-cumárico e caurenóico, 230 nm para o ácido benzoilgrandiflórico e 270 nm para o ácido cinamoilgrandiflórico. Essas alterações conduziram à obtenção de picos com pureza espectral para todos os marcadores químicos. Adicionalmente, a condição K teve seu gradiente de eluição com ACN interrompido aos 38 min, haja visto que nenhum pico dos marcadores químicos eluiu após esse período.

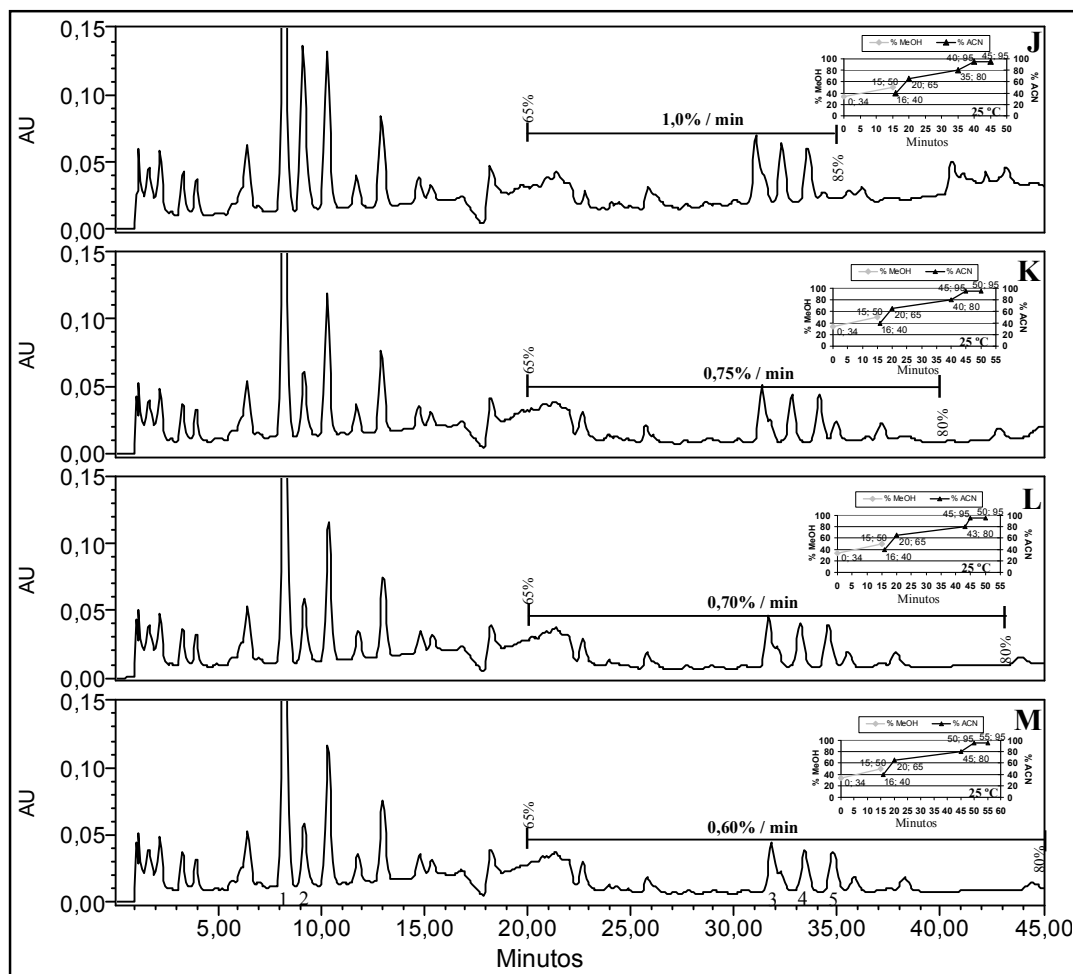


Figura 32. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para folhas de *Mikania laevigata* durante o desenvolvimento do método. Vide condições cromatográficas J-M na Tabela 10 item 4.9.3.3 ou nos gráficos inseridos nos cromatogramas de maneira simplificada. **Picos:** 1, ácido *o*-cumárico; 2, cumarina; 3, ácido benzoilgrandiflórico; 4, ácido cinamoilgrandiflórico; 5, ácido caurenóico.

A condição cromatográfica também incluiu a eluição isocrática por 2,0 min de 95% de ACN para a limpeza da coluna, seguido por um período de 5 min de gradiente linear reverso para a condição inicial (34% de MeOH), sendo concluído após 10 min de re-equilíbrio da coluna. No total, a corrida cromatográfica teve duração de 55 min, um tempo razoável considerando a complexidade da matriz e as diferenças de polaridade entre os marcadores químicos analisados. Finalmente, foi introduzido um programa de detecção dos picos dos marcadores químicos (Tabela 32), o que permitiu registrar cada um deles no comprimento de onda de absorvância máxima, num único cromatograma (Figura 34).

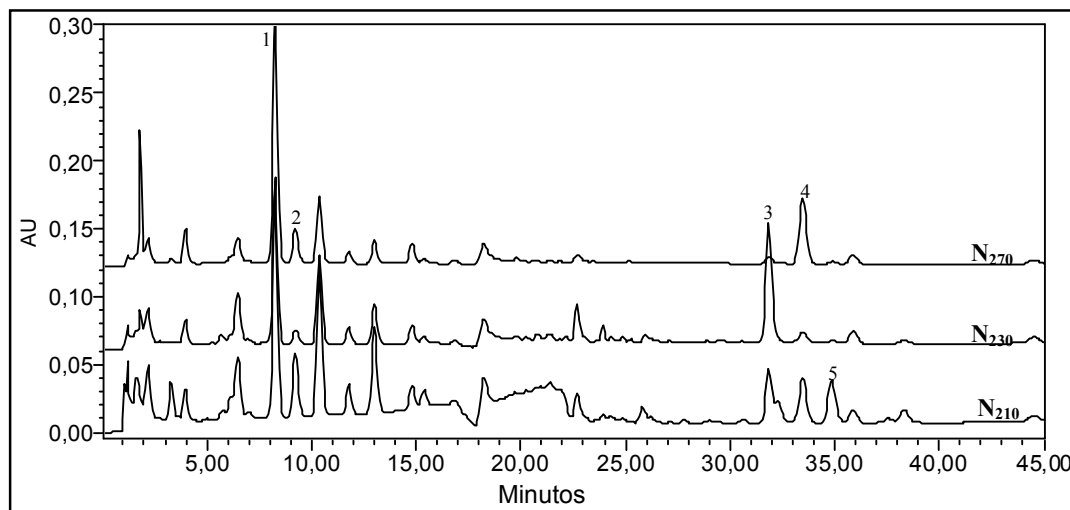


Figura 33. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para folhas de *Mikania laevigata* na condição N (condição estabelecida). **Condições cromatográficas:** vide Parte Experimental, item 4.9.5.1. Detecção: N₂₁₀: 210 nm; N₂₃₀: 230 nm; N₂₇₀: 270 nm. **Picos:** 1, ácido *o*-cumárico; 2, cumarina; 3, ácido benzoilgrandiflórico; 4, ácido cinamoilgrandiflórico; 5, ácido caurenóico.

Tabela 32. Programa de detecção empregado para registro de perfis cromatográficos e análise de marcadores químicos em folhas de *Mikania laevigata*.

Intervalo de tempo (min)	Comprimento de onda (nm)	Marcador químico detectado
0–30	210	ácido <i>o</i> -cumárico e cumarina
31.0–32.4	230	ácido benzoilgrandiflórico
32.5–34.0	270	ácido cinamoilgrandiflórico
34.1–38.0	210	ácido caurenóico

Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.9.5.1.

A confiabilidade da condição estabelecida foi examinada por testes de adequação do sistema, compreendo a avaliação da resolução (R_s), fator de cauda (T), números de pratos teóricos (N), fator de retenção (k) e repetibilidade da resposta dos picos [DPR do tempo de retenção ($n = 6$) para os picos dos marcadores químicos]. Os resultados estão apresentados na Tabela 33, juntamente com os limites recomendados pelo FDA (FDA, 2000). Todos os valores determinados estão de acordo com as recomendações, exceto a resolução entre o ácido *o*-cumárico e a cumarina. Entretanto, considerando tratar-se de matriz biológica, esses valores podem ser aceitos, pois testes de adequação do sistema apresentam limites menos rigorosos para matrizes biológicas e análise de traços (DONG *et al.*, 2007). Além disso, alguns autores consideram R_s de 1,5 adequada para análises quantitativas e não recomendam valores muito

superiores, que podem gerar aumento desnecessário no tempo de análise (MEYER, 1996; DONG *et al.*, 2007).

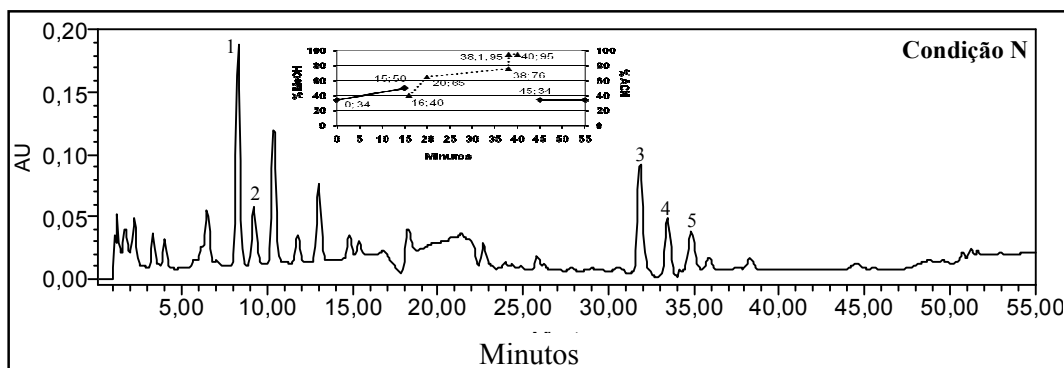


Figura 34. Cromatograma obtido por CLAE-DAD para folhas de *Mikania laevigata* usando a condição cromatográfica estabelecida. **Condição cromatográfica:** vide Parte Experimental, item 4.9.5.1 ou no gráfico inserido no cromatograma de maneira simplificada. **Programa de detecção:** 0-30 min: 210 nm; 31,0-32,4 min: 230 nm; 32,5-34,0 min: 270 nm; 34,1-38,0: 210 nm. **Picos:** 1, ácido *o*-cumárico; 2, cumarina; 3, ácido benzoilgrandiflórico; 4, ácido cinamoilgrandiflórico; 5, ácido caurenóico.

Retenção reprodutível e resolução dos marcadores químicos são de suma importância para métodos de rotina. Assim, testes de adequação do sistema são diretamente afetados pela repetibilidade da retenção da amostra. Variações na retenção dos picos de corrida para corrida indicam irreprodutibilidade do sistema (DONG *et al.*, 2007). No método estabelecido, o maior DPR para o tempo de retenção foi observado para a cumarina (0,40%), atestando a alta reprodutibilidade para a condição cromatográfica, incluindo o tempo adequado de re-equilíbrio.

Tabela 33. Parâmetros de adequação do sistema determinados para as análises de marcadores químicos em folhas de *Mikania laevigata*, empregando a condição cromatográfica estabelecida.

Parâmetros	R_s	T	N	k	t_R (min)	RSD for t_R ($n=6$)
Marcadores químicos						
ácido <i>o</i> -cumárico (1)*	1,88	1,05	5.125	6,69	8,24	0,32
cumarina (2)	1,88	1,19	5.085	7,57	9,18	0,40
ácido benzoilgrandiflórico (3)	2,62	1,10	43.398	28,58	31,78	0,09
ácido cinamoilgrandiflórico (4)	2,62	1,09	43.175	30,06	33,27	0,03
ácido caurenóico (5)	2,03	1,08	42.024	31,42	34,76	0,08
Valores recomendados pelo FDA (FDA, 2000)	$R_s > 2$	$T \leq 2$	>2.000	$k > 2,0$	-	RSD $\leq 1\%$, para $n \geq 5$

*Amostras fortificadas de *M. laevigata* foram empregadas nesse ensaio, pela adição dessa substância (0,01 mg/mL). Vide detalhes no texto. **Condição cromatográfica:** vide Parte Experimental, item 4.9.5.1. **Programa de detecção:** 0-30 min: 210 nm; 31,0-32,4 min: 230 nm; 32,5-34,0 min: 270 nm; 34,1-38,0: 210 nm.

5.4.2 *M. glomerata*

As condições cromatográficas estabelecidas para *M. laevigata* foram avaliadas em amostras de folhas de *M. glomerata*. Como previamente descrito (item 5.3), apenas os diterpenos caurânicos foram identificados como marcadores químicos para as amostras de *M. glomerata* (Figura 35a), embora alguns autores relataram a ocorrência de ácido *o*-cumárico e cumarina nessa espécie (OLIVEIRA *et al.*, 1984; LANÇAS *et al.*, 1997; VENEZIANI e OLIVEIRA, 1999; CELEGHINI *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2006; F.BRAS IV, 2005). Portanto, as condições cromatográficas para *M. glomerata* não foram modificadas, desde que cumarina pode ser detectada em outras amostras.

Testes de adequação do sistema foram realizados para *M. glomerata*, de forma similar à *M. laevigata* (Tabela 34). Todos os parâmetros analisados encontram-se dentro dos limites estabelecidos pelo FDA, exceto a resolução do ácido caurenóico (FDA, 2000). Apesar disso, o valor obtido ($R_s = 1,73$) pode ser considerado adequado para análises quantitativas (MEYER, 1996; DONG *et al.*, 2007), como previamente discutido para *M. laevigata* (item 5.4.1). Da mesma forma, a pureza dos picos correspondentes aos três diterpenos caurânicos, atestada pela homogeneidade espectral, indicaram a seletividade do método também para *M. glomerata*.

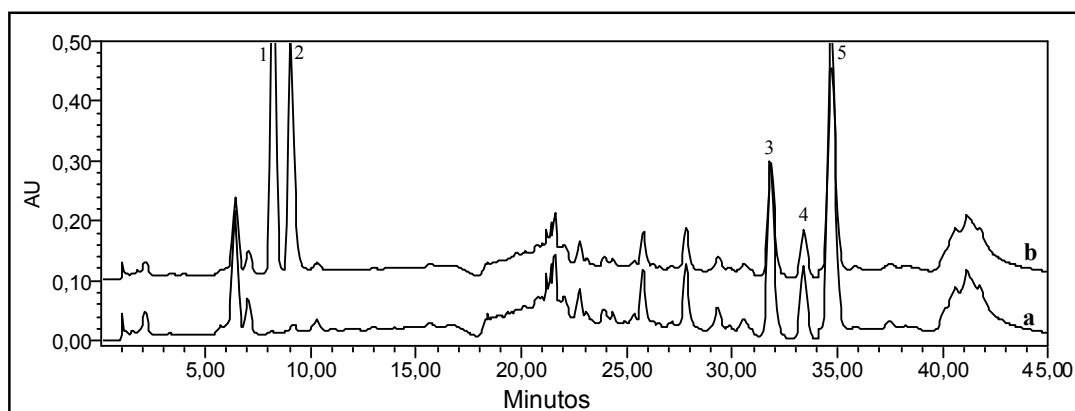


Figura 35. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para folhas de *Mikania glomerata* na condição cromatográfica estabelecida. (a), extrato sem adição de substâncias de referência; (b), extrato fortificado com ácido *o*-cumárico e cumarina. **Condição cromatográfica:** vide Parte Experimental, item 4.9.5.1. **Programa de detecção:** 0-30 min: 210 nm; 31,0-32,4 min: 230 nm; 32,5-34,0 min: 270 nm; 34,1-38,0: 210 nm. **Picos:** 1, ácido *o*-cumárico; 2, cumarina; 3, ácido benzoilgrandiflorico; 4, ácido cinamoilgrandiflorico; 5, ácido caurenóico.

Tabela 34. Parâmetros de adequação do sistema determinados para as análises de marcadores químicos em folhas de *Mikania glomerata*, empregando a condição cromatográfica estabelecida.

Parâmetros Marcadores químicos	R_s	T	N	k	t_R (min)	RSD for t_R ($n=6$)
ácido <i>o</i> -cumárico (1)*	1,73	1,08	5.614	6,66	8,22	0,24
cumarina (2)	1,73	1,39	5.055	7,43	9,05	0,31
ácido benzoilgrandiflórico (3)	2,51	1,12	44.944	28,68	31,82	0,05
ácido cinamoilgrandiflórico (4)	2,51	1,09	43.920	30,06	33,27	0,03
ácido caurenóico (5)	1,73	1,19	40.122	31,36	34,69	0,05
Valores recomendados pelo FDA (FDA, 2000)	$R_s > 2$	$T \leq 2$	>2.000	$k > 2,0$	-	RSD $\leq 1\%$, para $n \geq 5$

*Amostras fortificadas de *M. glomerata* foram obtidas por adição dessas substâncias (0,01 mg/mL cada). Vide texto para detalhes. **Condição cromatográfica:** vide Parte Experimental, item 4.9.5.1. **Programa de detecção:** 0-30 min: 210 nm; 31,0-32,4 min: 230 nm; 32,5-34,0 min: 270 nm; 34,1-38,0: 210 nm.

Considerando que *M. glomerata* e *M. laevigata* são matrizes diferentes e que o ácido *o*-cumárico e a cumarina podem ocorrer em amostras da primeira espécie, realizou-se avaliação da seletividade do método para *M. glomerata*. Amostras de *M. glomerata* foram fortificadas com ácido *o*-cumárico e cumarina e o cromatograma resultante exibiu pureza de picos para ambos os marcadores (Figura 35b). Testes de adequação do sistema realizados para esses marcadores químicos nas amostras de *M. glomerata* fortificadas também se encontraram dentro dos limites recomendados pelo FDA (FDA, 2000), com exceção da resolução ($R_s = 1,73$). Entretanto, esse valor foi considerado adequado, conforme previamente discutido para o ácido caurenóico nessa espécie. Portanto, os resultados obtidos confirmam que o método é seletivo e reprodutivo para identificar todos os marcadores químicos nessa espécie.

5.4.3 Análise dos perfis cromatográficos

Tanto nos perfis cromatográficos exploratórios dos extratos brutos (item 5.1), bem como nas amostras de *M. laevigata* e *M. glomerata* empregadas durante o desenvolvimento do método cromatográfico (item 5.3.1 e 5.3.2) foram observadas diferenças marcantes entre ambas as espécies de guaco trabalhadas, com presença dos derivados caurânicos (ácidos benzoilgrandiflórico, cinamoilgrandiflórico e caurenóico) em ambas as espécies e a ausência dos derivados cinâmicos (cumarina e ácido *o*-cumárico) na segunda espécie.

Em conformidade com os dados do presente estudo, diferentes acessos de *M. glomerata* coletados em distintas regiões do Estado de São Paulo também não apresentaram

cumarina (REHDER *et al.*, 2000). Entretanto, não é possível assegurar que *M. glomerata* não contenha esses compostos, desde que esses constituintes já foram relatados para essa espécie (OLIVEIRA *et al.*, 1984; VILEGAS; MAECHI, 1997; VENEZIANI; OLIVEIRA; 1999; CELEGHINI *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*; 2006).

Os resultados conflitantes podem ser originários de identificação botânica incorreta da espécie nesses estudos, visto que espécies de *Mikania* conhecidas como guaco apresentam semelhanças morfológicas (RITTER *et al.*, 1992; RITTER; MIOTTO, 2005). Situação semelhante, de identificação errônea de espécies medicinais, tem ocorrido com a espécie *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *Maytenus aquifolium* Mart. (DUARTE; DEBUR, 2005; TIBERT *et al.*, 2007).

Existem muitas controvérsias sobre a identificação botânica das espécies de guaco e, perante a confusão existente observa-se a necessidade iminente de estudos que estabeleçam as diferenças químicas e genéticas de diferentes acessos dessas espécies e que, possam definir por meio de perfis cromatográficos e DNA *fingerprints*, a espécie e suas variedades que devem ser cultivadas para a produção de fitoterápicos.

5.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

A extração é uma etapa crucial para a quantificação simultânea de derivados do ácido cinâmico [ácido *o*-cumárico (**42**) e cumarina (**33**)] e de diterpenos caurânicos [ácidos caurenóico (**2**), benzoilgrandiflórico (**39**) e cinamoilgrandiflórico (**4**)] em *M. laevigata* e *M. glomerata* (BERTOLUCCI *et al.*, 2009), uma vez que os compostos selecionados apresentam diferenças marcantes na polaridade, sendo os constituintes da segunda classe, consideravelmente mais lipofílicos do que o da primeira. Por isso, avaliaram-se diversas condições extrativas de sonicação com distintos solventes, tempo e ciclos de extração (Tabela 35; Figuras 36 e 37). O rendimento das extrações foi avaliado comparando-se as áreas dos picos das substâncias de interesse.

Tabela 35. Condições extrativas ensaiadas durante o desenvolvimento do método para quantificação de marcadores químicos em *M. laevigata* e *M. glomerata*. Os resultados correspondentes estão apresentados nas Figuras 30 e 31.

Código	Sonicação		
	Solvente	Tempo (min)	Ciclos × volume (mL)
EtOAc	Acetato de etila	20	3 × 30
DCM	Diclorometano	20	3 × 30
D/E	Diclorometano seguido de Etanol	20	3 × 30 cada
EtOH	Etanol	20	3 × 30
D:E 20	Diclorometano:Etanol 1:1 (v/v)	20	3 × 30
D:E 30	Diclorometano:Etanol 1:1 (v/v)	30	3 × 30
D:E 45	Diclorometano:Etanol 1:1(v/v)	45	3 × 30
D:E 60	Diclorometano:Etanol 1:1 (v/v)	60	3 × 30

O rendimento extrativo dos ácidos cinamoilgrandiflórico (**4**) (*M. laevigata* e *M. glomerata*) e benzoilgrandiflórico (**39**) (*M. laevigata*) não variou estatisticamente em todas as condições avaliadas ($p > 0,05$), ao contrário dos demais fitoconstituintes avaliados. No caso de *M. laevigata* (Figura 36A), extração com EtOH absoluto (3 × 20 min) resultou em altos rendimentos das substâncias de interesse, exceto para o ácido *o*-cumárico (**42**) (BERTOLUCCI *et al.*, 2009). Extração com CH₂Cl₂ seguida de EtOH, três ciclos de 20 min cada (condição D/E), mostrou ser uma condição adequada para os diterpenos caurânicos (**2**, **39** e **4**) e ácido *o*-cumárico (**42**), mas não foi adequada para a extração de cumarina (**33**). Esse resultado conduziu à seleção do EtOH como solvente extrator dos marcadores químicos de *M. laevigata*, haja visto que a cumarina (**33**) é considerada o principal constituinte ativo de ambas espécies de *Mikania* e o ácido *o*-cumárico (**42**) é seu precursor biossintético e, portanto, espera-se encontrar baixos teores na droga vegetal (OLIVEIRA, *et al.* 1984; SANTOS *et al.*, 1984; VENEZIANI; OLIVEIRA, 1999; . SANTOS *et al.*, 2006).

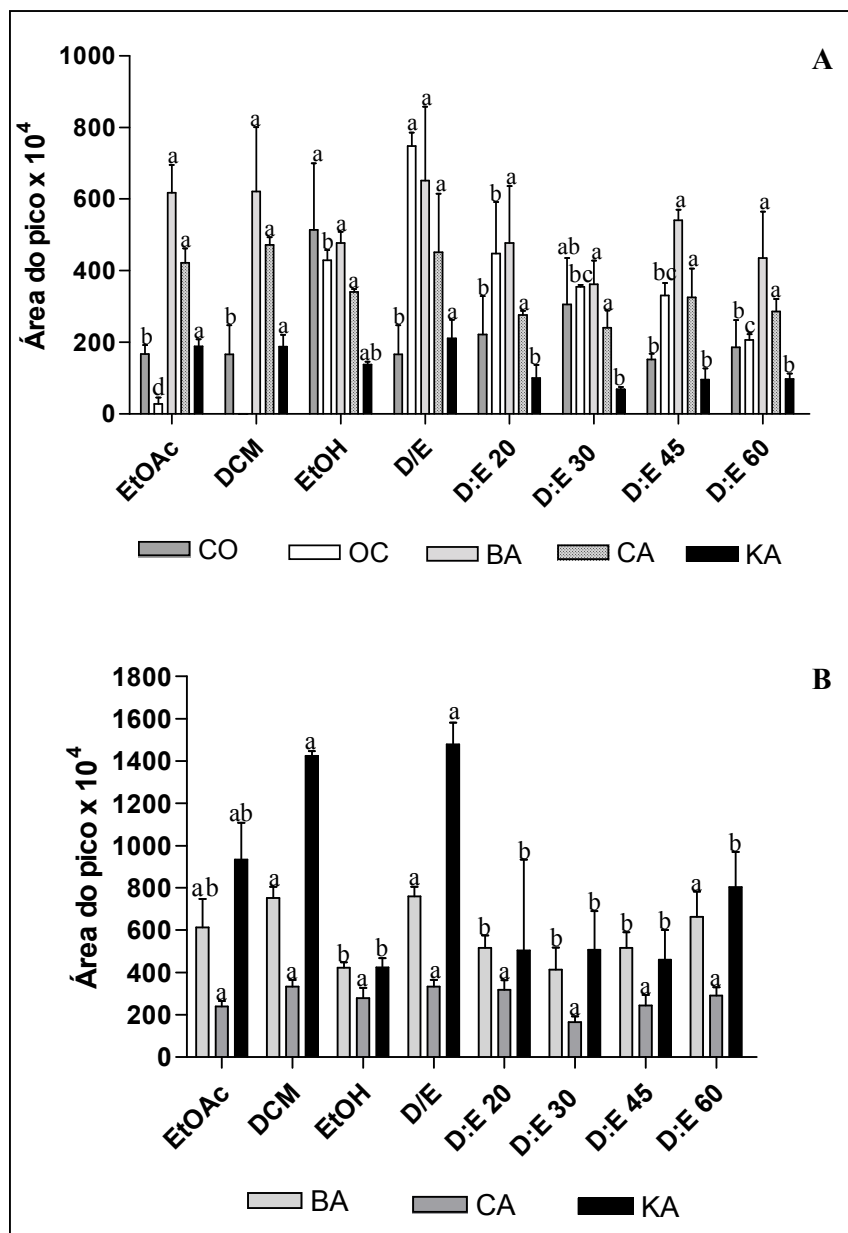


Figura 36. Efeito de diferentes condições extrativas no rendimento de marcadores de *M. laevigata* (A) e *M. glomerata* (B). As condições de extração avaliadas nesse estudo estão detalhadas na Tabela 35. CO, cumarina; OC, ácido *o*-cumárico; BA, ácido benzoilgrandiflórico; CA, ácido cinamoilgrandiflórico; KA, ácido caurenóico. Resultados expressos como média das áreas \pm DPR ($n = 3$) dos picos. Colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes, para cada substância ($p < 0,05$).

As condições extrativas avaliadas para *M. glomerata* sugeriram que CH_2Cl_2 (3×20 min) e CH_2Cl_2 seguido de EtOH (3×20 min cada solvente) são as condições mais efetivas para extração simultânea dos marcadores químicos encontrados nessa espécie [ácidos caurenóico (2), benzoilgrandiflórico (39) e cinamoilgrandiflórico (4)] (BERTOLUCCI *et al.*,

2009). As áreas dos picos obtidos pelas condições supracitadas não diferiram estatisticamente da extração com EtOAc. Esta última, no entanto, não foi significativamente diferente das demais condições avaliadas nesse estudo (Figura 36B) (BERTOLUCCI *et al.*, 2009). Ácido *o*-cumárico e cumarina não foram encontrados nas matrizes analisadas e, portanto, nenhuma conclusão sobre o melhor extrator pôde ser obtida para essas substâncias em *M. glomerata* (BERTOLUCCI *et al.*, 2009).

Considerando que a meta inicial desse estudo era desenvolver um método que pudesse ser empregado indistintamente para a análise de ambas espécies de *Mikania*, selecionou-se EtOH como extrator para *M. glomerata*. O uso de condições analíticas idênticas para *M. laevigata* e *M. glomerata* constituiria uma ferramenta útil para a diferenciação das espécies, cujo emprego dá-se de forma indistinta, devido a similaridades da morfologia foliar, levando a erros na identificação. O fato da cumarina estar potencialmente presente em amostras de *M. glomerata*, e ser efetivamente extraída por EtOH, contribuiu para a seleção desse solvente como extrator, ao contrário das condições de extração com DCM ou D/E (BERTOLUCCI *et al.*, 2009). A eficácia do uso de EtOH como extrator para ambas espécies também foi avaliada em estudos de recuperação (item 5.6.7) (BERTOLUCCI *et al.*, 2009).

A partir da definição de EtOH como extrator, avaliou-se o número de ciclos requerido para a máxima extração das substâncias de interesse (Figura 37).

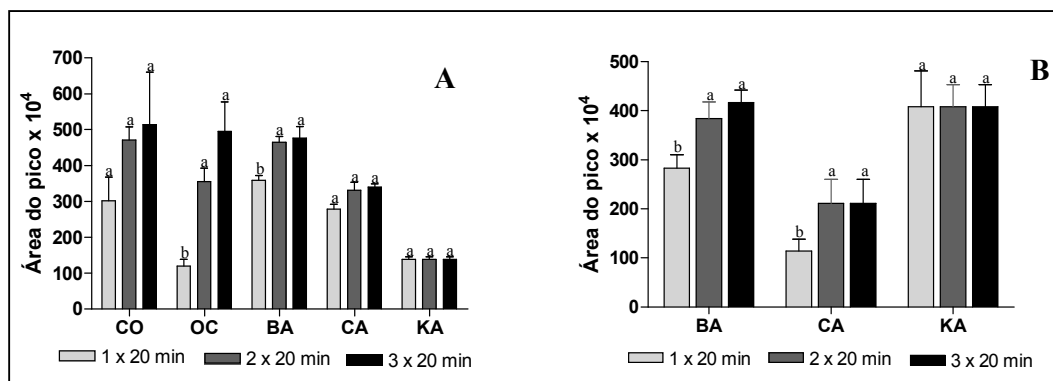


Figura 37. Efeito de diferentes ciclos de extração no rendimento de marcadores de *M. laevigata* (A) e *M. glomerata* (B) por sonicação com etanol. CO, cumarina; OC, ácido *o*-cumárico; BA, ácido benzoilgrandiflórico; CA, ácido cinamoilgrandiflórico; KA, ácido caurenóico. Resultados expressos como média das áreas \pm DPR ($n = 3$) dos picos. Colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes, para cada substância ($p < 0,05$).

Os dados obtidos indicaram não haver diferenças estatisticamente significativas entre as áreas dos picos das substâncias avaliadas, resultantes do segundo e terceiro ciclos de extração ($p > 0,05$). Portanto, sonicação com EtOH, em dois ciclos de 20 min cada, foi definido como a condição extrativa para ambas espécies de *Mikania* (BERTOLUCCI *et al.*, 2009).

4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CLAE-DAD PARA QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS EM *M. laevigata*

A condição cromatográfica definida e que resultou na adequada separação das cinco substâncias de interesse [(cumarina (33) e ácidos *o*-cumárico (42), caurenóico (2), benzoilgrandiflórico (39) e cinamoilgrandiflórico (4)] nas matrizes de *M. laevigata* e *M. glomerata* foi validada seguindo os critérios do guia ICH (*International Conference on Harmonisation*) e da Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

4.6.1 Seletividade

A seletividade da condição cromatográfica estabelecida (item 5.4) foi avaliada para amostras de *M. laevigata* e *M. glomerata* preparadas conforme o método extrativo otimizado (sonicação com EtOH absoluto, 2×30 mL) (item 5.5) e para o *pool* das substâncias marcadoras (item 4.9.3.2). A condição cromatográfica estabelecida foi seletiva para os cinco constituintes químicos de interesse [(cumarina (33) e ácidos *o*-cumárico (42), caurenóico (2), benzoilgrandiflórico (39) e cinamoilgrandiflórico (4)] em ambas as espécies e para o *pool* de referências. A Figura 38 ilustra a seletividade obtida para os marcadores químicos em *M. laevigata*, assegurada pela homogeneidade espectral dos picos nas bases ascendente e descendente dos picos, determinada pelo DAD, nos comprimentos de onda específicos para cada marcador. Essas análises garantem que as determinações quantitativas dos marcadores químicos nos extratos etanólicos de *M. laevigata* e *M. glomerata* não estão sujeitas a interferências de outros componentes das matrizes (BERTOLUCCI *et al.*, 2009).

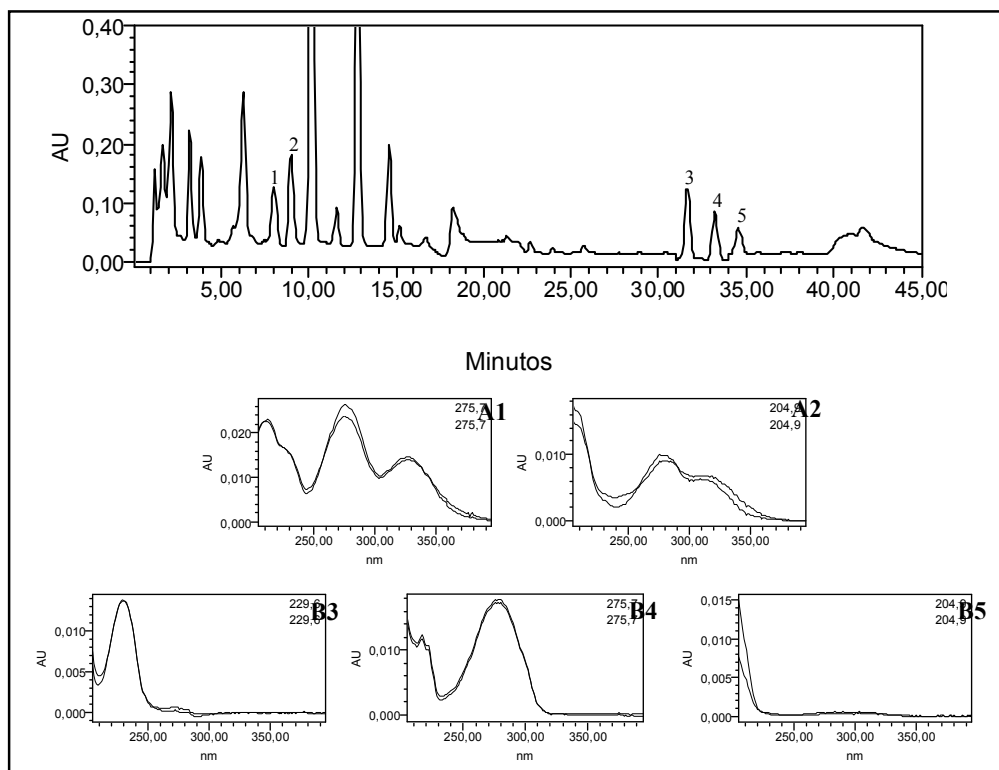


Figura 38. Cromatograma obtido por CLAE-DAD para extrato etanólico de folhas de *M. laevigata* para avaliação da seletividade dos marcadores químicos. **Condição cromatográfica:** vide Parte Experimental, item 4.9.5.1. **Programa de detecção:** 0-30 min: 210 nm; 31,0-32,4 min: 230 nm; 32,5-34,0 min: 270 nm; 34,1-38,0: 210 nm. **Picos:** 1, ácido *o*-cumárico; 2, cumarina; 3, ácido benzoilgrandiflórico; 4, ácido cinamoilgrandiflórico; 5, ácido caurenóico. Os espectros no UV correspondem a extração na base ascendente e descendente dos respectivos picos dos derivados cinâmicos (A) e caurânicos (B) obtidos *on-line* pelo detector DAD.

A confiabilidade da condição cromatográfica estabelecida foi garantida por testes de adequação do sistema, compreendendo avaliações de resolução, fator de cauda, número de pratos teóricos, fator de retenção e repetibilidade da resposta dos picos, avaliada pelo DPR do tempo de retenção de seis determinações para cada pico de interesse. Os resultados obtidos são similares àqueles previamente descritos para os extratos em CH_2Cl_2 :EtOH (1:1), relatados durante o desenvolvimento da condição de eluição (item 5.4.2), inclusive para as amostras de *M. glomerata* fortificadas com ácido *o*-cumárico e cumarina (BERTOLUCCI *et al.*, 2009).

Todos os picos referentes aos marcadores químicos exibiram pureza espectral e os valores obtidos para os testes de adequação do sistema estão de acordo com as recomendações do FDA, com exceção da resolução de cumarina / ácido *o*-cumárico em *M. laevigata* (R_s

=1,77) e *M. glomerata* ($R_s = 1,72$), bem como de ácido caurenóico para a última espécie ($R_s = 1,89$) (FDA, 2000). No entanto, isso não constitui um problema, e valores menos rigorosos são aceitos para testes de adequação do sistema em matrizes biológicas e análise de traços (DONG *et al.*, 2007). Alguns autores consideram $R_s > 1,5$ adequada para análises quantitativas e não recomendam valores muito superiores, pois podem implicar em tempos longos de análise (MEYER, 1996; DONG *et al.*, 2007).

Tabela 36. Parâmetros de adequação do sistema determinados para as análises de marcadores químicos em folhas de *Mikania laevigata*, empregando a condição cromatográfica estabelecida.

Parâmetros	R_s	T	N	k	RT	RSD (RT, n=6)
M. laevigata						
ácido o-cumárico	1,77	1,06	5.577	6,63	8,19	0,16
cumarina	1,77	1,38	5.040	7,38	9,07	0,16
ácido benzoilgrandiflórico	2,75	1,08	44.977	28,29	31,59	0,02
ácido cinamoilgrandiflórico	2,75	1,00	43.266	29,86	33,15	0,02
ácido caurenóico	2,02	0,92	40.027	31,18	34,51	0,02
M. glomerata						
ácido o-cumárico *	1,72	1,10	5.586	6,67	8,22	0,22
cumarina *	1,72	1,38	5.037	7,43	9,05	0,29
ácido benzoilgrandiflórico	2,57	1,08	44.609	28,33	31,66	0,04
ácido cinamoilgrandiflórico	2,57	1,00	44.386	29,87	33,17	0,03
ácido caurenóico	1,89	0,95	42.787	31,18	34,52	0,03
Valores recomendados pelo FDA (FDA, 2000)	$R_s > 2/^{**}R_s > 1.5$	$T \leq 2$	>2.000	$k > 2.0$	-	RSD $\leq 1\%$. para $n \geq 5$

* Amostras fortificadas de *M. glomerata* foram empregadas nesse ensaio, pela adição dessas substâncias (0,01 mg/mL). **Condição cromatográfica:** vide Parte Experimental, item 4.9.5.1. **Programa de detecção:** 0-30 min: 210 nm; 31,0-32,4 min: 230 nm; 32,5-34,0 min: 270 nm; 34,1-38,0: 210 nm.

4.6.2 Linearidade

Para a construção das curvas analíticas dos marcadores químicos, visando avaliar a linearidade do método, fez-se necessário estimar inicialmente a faixa de concentrações dessas substâncias nas drogas vegetais de *Mikania* spp. Esses dados foram obtidos a partir dos materiais vegetais trabalhados e de dados de teores previamente relatados na literatura (VILEGAS *et al.*, 1997; PEREIRA *et al.*, 2000 e F.BRAS.IV, 2005). Os dados estimados e os valores relatados na literatura estão apresentados na Tabela 37.

Tabela 37. Teores estimados dos marcadores químicos em *M. laevigata* e *M. glomerata* para construção das curvas analíticas.

Teores (%)	A	B	C	D
Marcadores químicos				
<i>M. laevigata</i>				
ácido <i>o</i> -cumárico	0,12	0,12	-	-
cumarina	0,25	0,07	-	0,10
ácido benzoilgrandiflórico	0,28	0,32	-	-
ácido cinamoilgrandiflórico	0,18	0,17	-	-
ácido caurenóico	0,21	0,32	-	-
<i>M. glomerata</i>				
ácido <i>o</i> -cumárico	-	-	-	-
cumarina	-	-	0,44	-
ácido benzoilgrandiflórico	0,19	0,28	-	-
ácido cinamoilgrandiflórico	0,09	0,07	-	-
ácido caurenóico	0,73	0,96	0,22	-

Legenda: **A**, material vegetal que originou o extrato etanólico bruto obtido por percolação (item 4.7); **B**, material vegetal utilizado nos ensaios de otimização das condições de extração dos marcadores químicos (item 4.9.3); **C**, dados relatados por Vilegas *et al.* (1997); **D**, teor (%) mínimo especificado pela Farmacopéia Brasileira (F.Bras.IV, 2005).

Foram obtidas duas curvas analíticas, em dois dias consecutivos, para cada marcador. Diferentes alíquotas de soluções estoques de ácido *o*-cumárico (100 e 250 µg/mL), cumarina (50 e 200 µg/mL), ácido benzoilgrandiflórico (250 µg/mL), ácido cinamoilgrandiflórico (100 µg/mL) e ácido caurenóico (160 e 500 µg/mL) foram injetadas no cromatógrafo, em triplicata, na faixa de 4-32 µL. A Tabela 38 apresenta, para cada marcador, nos dois dias de análise, os valores de massa injetada e suas respectivas áreas e desvio padrão relativo.

Todas as curvas analíticas construídas indicaram relação linear entre a massa injetada das substâncias (µg) *versus* as áreas dos picos correspondentes, sendo obtidos coeficientes de determinação (r^2) com valores superiores a 0,9993 (BERTOLUCCI *et al.*, 2009). Os dados da análise de regressão linear, dos dois dias de análises, e as curvas analíticas obtidas pela média das duas curvas, para os derivados cinâmicos e para os diterpenos caurânicos, estão apresentados nas Figuras 39 e 40 e Tabelas 39 e 40, respectivamente.

Tabela 38. Massa injetada, áreas médias ($n = 3$) e desvio padrão relativo das curvas analíticas, para cada marcador químico, nos dois dias de análise.

Volume injetado (μL)	Massa injetada (μg)	Dia 1		Dia 2	
		Área média	DPR (%)	Área média	DPR (%)
ÁCIDO <i>o</i>-CUMÁRICO					
Solução de referência (50 $\mu\text{g/mL}$)					
5,0	0,25	1.150.405	0,32	1.148.709	0,20
10,0	0,50	2.337.127	0,12	2.333.137	0,12
20,0	1,00	4.692.408	0,17	4.679.757	0,18
Solução de referência (200 $\mu\text{g/mL}$)					
10,0	2,00	9.293.700	0,26	9.281.363	0,29
20,0	4,00	18.766.253	0,30	18.743.090	0,30
CUMARINA					
Solução de referência (100 $\mu\text{g/mL}$)					
5,0	0,5	3.635.385	0,06	3.411.314	0,27
10,0	1,0	7.298.436	0,19	7.267.659	0,19
30,0	3,0	23.761.650	0,23	23.687.880	0,22
Solução de referência (250 $\mu\text{g/mL}$)					
16,0	4,0	31.867.740	0,13	31.778.640	0,23
20,0	5,0	39.899.220	0,15	39.776.760	0,04
ÁCIDO BENZOILGRANDIFLÓRICO					
Solução de referência (250 $\mu\text{g/mL}$)					
4,0	1,0	2.218.407	0,08	2.280.597	0,59
8,0	2,0	4.501.400	0,20	4.636.321	0,28
16,0	4,0	9.444.620	0,14	9.338.970	0,92
24,0	6,0	14.236.440	0,17	14.244.719	0,42
32,0	8,0	19.045.825	0,17	19.152.341	0,40
ÁCIDO CINAMOILGRANDIFLÓRICO					
Solução de referência (100 $\mu\text{g/mL}$)					
4,0	1,0	1876616	0,97	1870902	0,11
8,0	2,0	3749158	0,15	3755151	0,15
16,0	4,0	5624942	0,24	5650982	0,08
24,0	6,0	7531447	0,06	7532222	0,31
32,0	8,0	11343732	0,10	11347536	0,31
ÁCIDO CAURENÓICO					
Solução de referência (160 $\mu\text{g/mL}$)					
5,0	0,5	309.124	0,71	308.556	1,04
10,0	1,0	1.059.492	1,08	1.040.605	2,47
30,0	3,0	1.724.775	2,31	1.803.826	1,05
Solução de referência (500 $\mu\text{g/mL}$)					
16,0	4,0	3.505.516	1,16	3.500.938	1,44
20,0	5,0	5.471.270	1,14	5.485.414	0,39

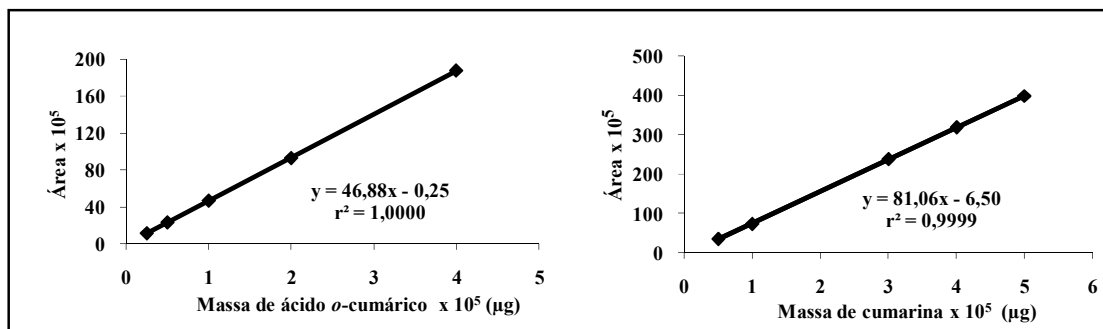


Figura 39. Média das curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD, em dois dias consecutivos, para os derivados cinâmicos.

Tabela 39. Resultados da regressão linear para curvas analíticas dos derivados cinâmicos, em dois dias consecutivos de análise.

Parâmetros estatísticos	Ácido <i>o</i> -cumárico		Cumarina	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
Faixa linear (µg)	0,25-4,0		0,5-5,0	
Coefficiente de correlação	1,0000	1,0000	1,0000	0,9999
DPR da curva (%)	0,60	0,58	2,17	2,45
Inclinação ($\times 10^5$)	46,91	46,86	81,11	81,03
Erro padrão da inclinação ($\times 10^5$)	0,1431	0,1400	0,2719	0,4265
Intercepto ($\times 10^5$)	-0,2355	-0,2616	-7,1570	-5,8470
Erro padrão do intercepto ($\times 10^5$)	0,2954	0,2890	0,8706	1,3650

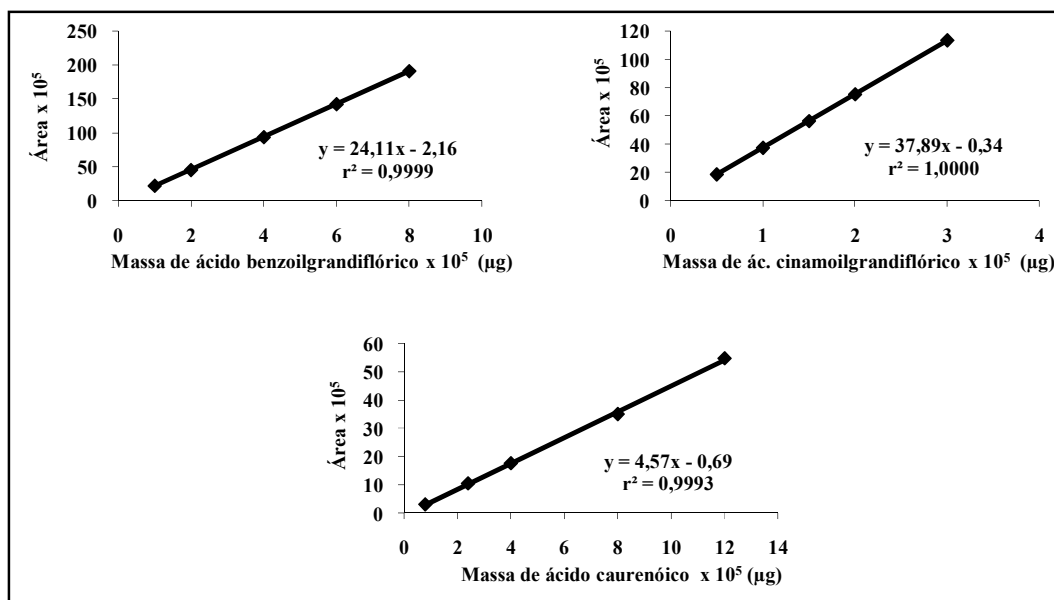


Figura 40. Média das curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD, em dois dias consecutivos, para os diterpenos caurânicos.

Tabela 40. Resultados da regressão linear para curvas analíticas dos diterpenos caurânicos, em dois dias consecutivos de análise.

Parâmetros estatísticos	BA		CA		KA	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
Faixa linear (μg)	1,0-8,0		1,0-8,0		0,5-5,0	
Coefficiente de correlação	0,9999	0,9999	1,0000	1,0000	0,9993	0,9992
DPR da curva (%)	0,59	0,83	0,32	0,19	2,62	2,81
Inclinação ($\times 10^5$)	24,12	24,10	37,89	37,90	4,5770	4,5800
Erro padrão da inclinação ($\times 10^5$)	0,103	0,1445	0,1003	0,0609	0,0698	0,0753
Intercepto ($\times 10^5$)	-2,404	-0,1922	-0,3646	-0,3275	-0,7570	-0,6367
Erro padrão do intercepto ($\times 10^5$)	0,5066	0,7110	0,1822	0,1107	0,4740	0,5111

Legenda: BA: ácido benzoilgrandiflórico; CA: ácido cinamoilgrandiflórico; KA: ácido caurenóico.

As curvas obtidas nos dois dias consecutivos não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$). Portanto, dentro das faixas de concentração estudadas dos marcadores químicos, o método apresentou linearidade adequada.

4.6.3 Limite de quantificação

A determinação dos limites de quantificação dos marcadores químicos foi realizada, em um primeiro momento, a partir da equação que emprega os parâmetros das curvas analíticas, conforme descrito no item 4.9.5.7. Para os cálculos, foram utilizados o desvio padrão do intercepto e a inclinação das curvas analíticas obtidas na determinação da linearidade, em dois dias de análises.

Posteriormente, o limite de quantificação foi determinado pela injeção, em quintuplicata, de massas decrescentes de cada marcador químico (0,025 – 0,7 μg), obtidas por diluições seqüenciais das soluções estoque (50 – 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou por ajustes no volume de injeção (item 4.9.5.7). Apresenta-se, na Tabela 41, as áreas médias e os desvios padrão relativos determinados para cada marcador químico, em massa (μg) injetada decrescente. O limite de quantificação foi determinado como a menor massa injetada que apresentou resultados com precisão adequada (DPR < 2,00%).

Tabela 41. Áreas médias e desvios padrão relativos para os marcadores químicos, empregados na determinação do limite de quantificação do método por CLAE-DAD.

Marcador químico	Massa injetada (µg)	Área média ($\times 10^5$)	DPR (%)
Ácido <i>o</i>-cumárico	0,100	4,3900	1,0922
	0,050	2,2557	1,8960
	0,045	1,6927	0,8997
	0,040	1,4945	3,2063
Cumarina	0,200	14,5149	0,3203
	0,100	7,2788	0,9371
	0,050	3,8220	1,3724
	0,025	1,7906	3,7088
Ácido benzoilgrandiflórico	0,500	11,2954	0,5112
	0,250	5,2913	1,9316
	0,200	4,2912	2,8100
Ácido cinamoilgrandiflórico	0,100	3,7213	0,4474
	0,050	1,8976	1,3897
	0,025	0,9730	1,8388
	0,0125	0,3554	6,8648
Ácido caurenóico	0,800	3,1269	1,9483
	0,700	2,8899	3,0006

Os valores de limites de quantificação obtidos por meio dos dois métodos estão listados na Tabela 42.

Tabela 42. Limite de quantificação (LQ) dos marcadores químicos determinados pela equação de regressão e experimentalmente a partir dos valores de desvio padrão relativo das áreas dos picos.

Marcador químico	LQ curva analítica (µg)		LQ experimental DPR < 2% (µg)
	Dia 1	Dia 2	
Ácido <i>o</i> -cumárico	0,0629	0,0616	0,045
Cumarina	0,1073	0,1684	0,050
Ácido benzoilgrandiflórico	0,2100	0,2950	0,250
Ácido cinamoilgrandiflórico	0,0480	0,0292	0,025
Ácido caurenóico	1,0354	1,1159	0,800

Os dados da Tabela 42 indicam proximidade entre os valores calculados pela curva analítica no 2º dia e os determinados experimentalmente pelo DPR das áreas dos picos, com exceção da cumarina.

A determinação do limite de quantificação com base nos parâmetros da curva analítica é útil para estimar os valores dos limites de quantificação do analito. Porém, a injeção de soluções diluídas do analito no cromatógrafo permite avaliar o DPR entre as áreas dos picos e determinar com precisão e exatidão, os limites de quantificação.

4.6.4 Limite de detecção

Inicialmente, os limites de detecção dos marcadores químicos foram estimados a partir da equação descrita no item 4.9.5.8. Os valores de desvio padrão do intercepto e inclinação foram obtidos das curvas analíticas correspondentes a cada marcador químico, nos dois dias de análise.

Em seguida, foram realizadas injeções de massas decrescentes de cada marcador químico (0,007–0,24 µg), obtidas por diluições seqüenciais das soluções estoque (50–250 µg/mL) (item 4.9.5.4.2). Os valores de limites de detecção calculados pela curva analítica e pela razão sinal/ruído ($S/N = 3$) são apresentados na Tabela 43.

Tabela 43. Limite de detecção (LD) dos marcadores químicos determinados pela equação de regressão e experimentalmente a partir da razão sinal/ruído.

Marcador químico	LD curva analítica (µg)		LD (S/R = 3) (µg)
	Dia 1	Dia 2	
Ácido <i>o</i> -cumárico	0,0208	0,0203	0,013
Cumarina	0,0354	0,0555	0,015
Ácido benzoilgrandiflórico	0,0693	0,0973	0,075
Ácido cinamoilgrandiflórico	0,0158	0,0096	0,007
Ácido caurenóico	0,3416	0,3682	0,240

Os limites de detecção calculados pela equação, obtidos nos dias 1 e 2, não apresentaram variações consideráveis, com exceção do ácido benzoilgrandiflórico e cumarina. Pôde-se também observar que, com exceção da cumarina para a curva do dia 2, e do ácido

cinamoilgrandiflórico para a curva do dia 1, os valores dos limites de detecção determinados pela razão sinal/ruído estão abaixo daqueles obtidos pela curva analítica 2.

4.6.5 Estabilidade dos marcadores químicos

A estabilidade dos marcadores químicos nos extratos etanólicos empregados nas análises quantitativas foi avaliada, mantendo as amostras preparadas conforme descrito no item 4.9.5.2 no carrossel do amostrador do cromatógrafo em *vial*, à temperatura ambiente (23 ± 2 °C), e sob diferentes intervalos de tempo (0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 e 42 h). Tanto *M. laevigata* quanto *M. glomerata*, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (análise de variância e teste de Tukey; $p > 0,05$) entre os teores quantificados de cumarina e ácidos *o*-cumárico, benzoilgrandiflórico, cinamoilgrandiflórico e caurenóico dentro dos períodos ensaiados ($n = 6$ para cada matriz), conforme representado na Figura 41 (BERTOLUCCI *et al.*, 2009).

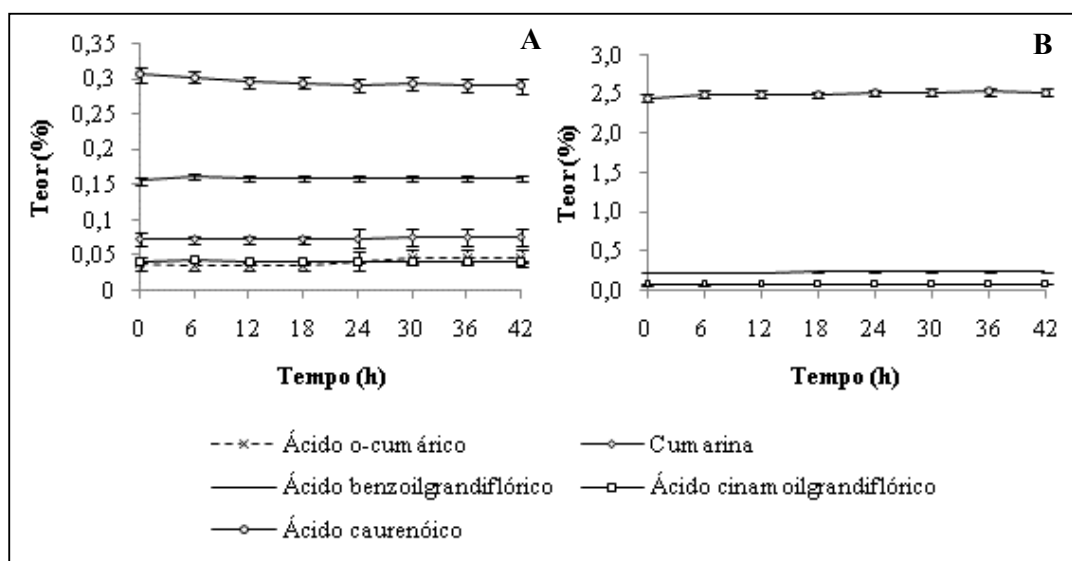


Figura 41. Teores médios ($n = 6$ para cada matriz) dos marcadores químicos durante a avaliação da estabilidade dos marcadores químicos nas amostras preparadas de *M. laevigata* (A) e *M. glomerata* (B) a temperatura ambiente (23 ± 2 °C), por até 42 h. Os dados são expressos como teor médio de seis determinações. As médias dos teores de todos os marcadores químicos, entre os períodos analisados, em ambas as espécies, não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

4.6.6 Precisão

5.6.6.1 Precisão intra-dia

A precisão intra-dia foi determinada pela análise dos teores dos marcadores químicos em seis amostras de drogas vegetais de cada espécie de guaco. Os teores e os desvios padrão relativos de cada marcador químico no material vegetal foram calculados.

A Tabela 44 apresenta os valores da precisão intra-dia obtidos para os marcadores químicos em *M. laevigata* e *M. glomerata*.

Os valores de desvio padrão relativo abaixo de 5,0 % indicam que o método desenvolvido apresenta precisão intra-dia adequada, segundo os critérios da ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 44. Teores percentuais e desvio padrão relativo de marcadores químicos de *M. laevigata* e *M. glomerata* utilizados para a determinação da precisão intra-dia do método.

Amostra	OC	CO	AB	CA	KA
<i>M. laevigata</i>					
1	0,0455	0,1100	0,1476	0,0612	0,3140
2	0,0447	0,1014	0,1507	0,0568	0,3122
3	0,0449	0,1079	0,1523	0,0601	0,3194
4	0,0450	0,1087	0,1527	0,0608	0,3162
5	0,0454	0,1070	0,1546	0,0596	0,3210
6	0,0497	0,1112	0,1582	0,0597	0,3247
Teor médio (%)	0,0457	0,1077	0,1527	0,0597	0,3179
DPR (%)	4,36	3,21	2,35	2,60	1,46
<i>M. glomerata</i>					
1	-	-	0,1270	0,0441	1,119
2	-	-	0,1165	0,0416	1,074
3	-	-	0,1231	0,0429	1,121
4	-	-	0,1202	0,0440	1,050
5	-	-	0,1233	0,0424	1,090
6	-	-	0,1244	0,0409	1,032
Teor médio (%)	-	-	0,1234	0,0426	1,0808
DPR (%)	-	-	3,09	3,05	3,36

Legenda: OC: ácido *o*-cumárico; CO: cumarina; AB: ácido benzoilgrandiflórico; CA: ácido cinamoilgrandiflórico; KA: ácido caurenóico.

5.6.6.2 Precisão inter-dia

A precisão inter-dia foi avaliada por meio de seis determinações dos teores dos marcadores químicos nas drogas vegetais de *M. laevigata* e *M. glomerata*, em dois dias consecutivos, com analistas diferentes ($n = 12$). Além dos teores, os desvios padrão relativos de cada marcador químico no material vegetal também foram calculados.

A Tabela 45 apresenta os valores para a precisão inter-dia obtidos para os marcadores químicos em *M. laevigata* e *M. glomerata*.

Os valores de desvio padrão relativo abaixo de 5,00% indicam que o método desenvolvido apresenta precisão inter-dia adequada, segundo critérios da ANVISA (BRASIL, 2003).

As médias dos teores entre os dois dias de determinações foram comparadas pelo teste t ($p < 0,05$). Os teores não diferiram entre o primeiro e o segundo dias de análises.

Tabela 45. Valores de teores percentuais e desvio padrão relativo de marcadores químicos de *M. laevigata* e *M. glomerata* empregados para determinação da precisão inter-dia do método.

Dia	Amostra	OC	CUM	AB	ACI	ACA
<i>M. laevigata</i>						
1	1	0,0455	0,1100	0,1476	0,0612	0,3140
	2	0,0447	0,1014	0,1507	0,0568	0,3122
	3	0,0449	0,1079	0,1523	0,0601	0,3194
	4	0,0450	0,1087	0,1527	0,0608	0,3162
	5	0,0454	0,1070	0,1546	0,0596	0,3210
	6	0,0497	0,1112	0,1582	0,0597	0,3247
2	1	0,0427	0,1033	0,1547	0,0624	0,3122
	2	0,0458	0,1066	0,1515	0,0639	0,3122
	3	0,0472	0,1069	0,1509	0,0619	0,3178
	4	0,0469	0,1103	0,1457	0,0585	0,3201
	5	0,0445	0,1104	0,1546	0,0618	0,3273
	6	0,0490	0,1139	0,1539	0,0573	0,3255
Teor médio (%)		0,0459	0,1081	0,1523	0,0603	0,3185
DPR (%)		4,37	3,20	2,21	3,49	1,69
<i>M. glomerata</i>						
1	1	-	-	0,1270	0,0441	1,119
	2	-	-	0,1165	0,0416	1,074
	3	-	-	0,1231	0,0429	1,121
	4	-	-	0,1202	0,0440	1,050
	5	-	-	0,1233	0,0424	1,090
	6	-	-	0,1244	0,0409	1,032
2	1	-	-	0,1281	0,0439	1,0946
	2	-	-	0,1225	0,0399	1,0066
	3	-	-	0,1270	0,0417	1,0728
	4	-	-	0,1203	0,0411	1,0125
	5	-	-	0,1244	0,0420	1,0747
	6	-	-	0,1183	0,0429	1,0864
Teor médio (%)		-	-	0,1229	0,0423	1,0694
DPR (%)		-	-	2,93	3,16	3,51

Legenda: OC: ácido *o*-cumárico; CUM: cumarina; AB: ácido benzoilgrandiflórico; ACI: ácido cinamoilgrandiflórico; ACA: ácido caurenóico. Os teores não diferiram entre o primeiro e o segundo dias de análises para todos os marcadores químicos, em ambas as espécies, pelo teste *t* ($p > 0,05$).

4.6.7 Exatidão

Os testes de recuperação foram realizados a partir da fortificação de amostras de folhas pulverizadas de *M. laevigata* e *M. glomerata* com massas conhecidas das substâncias de referência. A Tabela 46 mostra os resultados de recuperação para os marcadores químicos em ambas as espécies.

Tabela 46. Recuperação de derivados do ácido cinâmico e diterpenos caurânicos nas folhas de *M. laevigata* e *M. glomerata* (média, $n = 3$).

Analito	Nível de fortificação	Massa na droga vegetal ^a (µg)	Massa fortificada (µg)	Massa teórica ^b (µg)	Massa experimental ^c (µg)	DPR (%)	Recuperação ^d (%)
<i>M. laevigata</i>							
OC	1	0,15	0,25	0,40	0,42	3,54	105,29
	2	0,15	1,0	1,15	1,16	10,04	101,08
	3	0,15	2,0	2,15	2,25	8,51	104,93
CO	1	1,40	0,5	1,90	1,99	10,97	104,57
	2	1,40	1,5	2,90	3,05	5,93	105,03
	3	1,40	2,5	3,90	3,99	0,62	102,28
BA	1	3,64	1,5	5,15	5,29	5,75	102,82
CA	1	2,50	0,5	3,00	3,00	7,42	100,05
KA	1	4,59	1,0	5,59	5,58	3,67	99,87
<i>M. glomerata</i>							
OC	1	ausente	0,25	0,25	0,29	7,84	117,41
	2	ausente	1,0	1,00	0,86	6,92	86,32
	3	ausente	2,0	2,00	2,16	8,39	108,07
CO	1	ausente	0,5	0,50	0,37	5,19	73,24
	2	ausente	1,5	1,50	1,34	5,98	89,52
	3	ausente	2,5	2,50	2,29	0,63	91,63
BA	1	2,34	1,5	3,84	3,95	3,57	102,91
CA	1	1,00	0,5	1,50	1,56	3,69	104,17
KA	1	11,08	1,0	12,08	12,52	4,01	103,63

Legenda: OC: ácido *o*-cumárico; CO: cumarina; BA: ácido benzoilgrandiflórico; CA: ácido cinamoilgrandiflórico; KA: ácido caurenóico.

^a Massa média ($n = 3$) do marcador químico presente na droga vegetal correspondente a 10 µl de amostra injetada.

^b Massa (µg) do marcador químico na droga vegetal + massa fortificada (µg) = Massa teórica (µg)

^c Massa (µg) correspondente a 10 µl de amostra fortificada injetada no cromatografo.

^d % recuperação = (massa experimental ÷ massa teórica) x 100.

Para *M. laevigata*, a recuperação dos cinco marcadores químicos compreendeu a faixa de 99,9% a 105,3%, assim como para os diterpenos caurânicos em *M. glomerata*. Esses valores de recuperação obtidos estão próximos ao valor desejável de $100 \pm 2\%$ (SNYDER *et al.*, 1997; BRASIL, 2003; GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007). No entanto, em *M. glomerata*, a recuperação dos derivados cinâmicos (ácido *o*-cumárico e cumarina) encontrou-se na faixa de 73,2 a 117,4%, portanto, fora dos valores limítrofes desejáveis para exatidão de métodos

analíticos. A ausência dessas duas substâncias nas matrizes analisadas, pode explicar esse resultado, o que gerou baixas concentrações na amostra após a fortificação e, conseqüentemente, dispersão nos valores de recuperação.

4.6.8 Robustez

A robustez do método foi avaliada pela análise comparativa de amostras analisadas nas condições cromatográficas estabelecidas e frente a alterações deliberadas na temperatura da coluna (26 °C e 28 °C), lote da coluna e analistas.

As Figuras 42 e 43 apresentam os valores obtidos no estudo de robustez do método para os marcadores químicos em *M. laevigata* e *M. glomerata*, respectivamente.

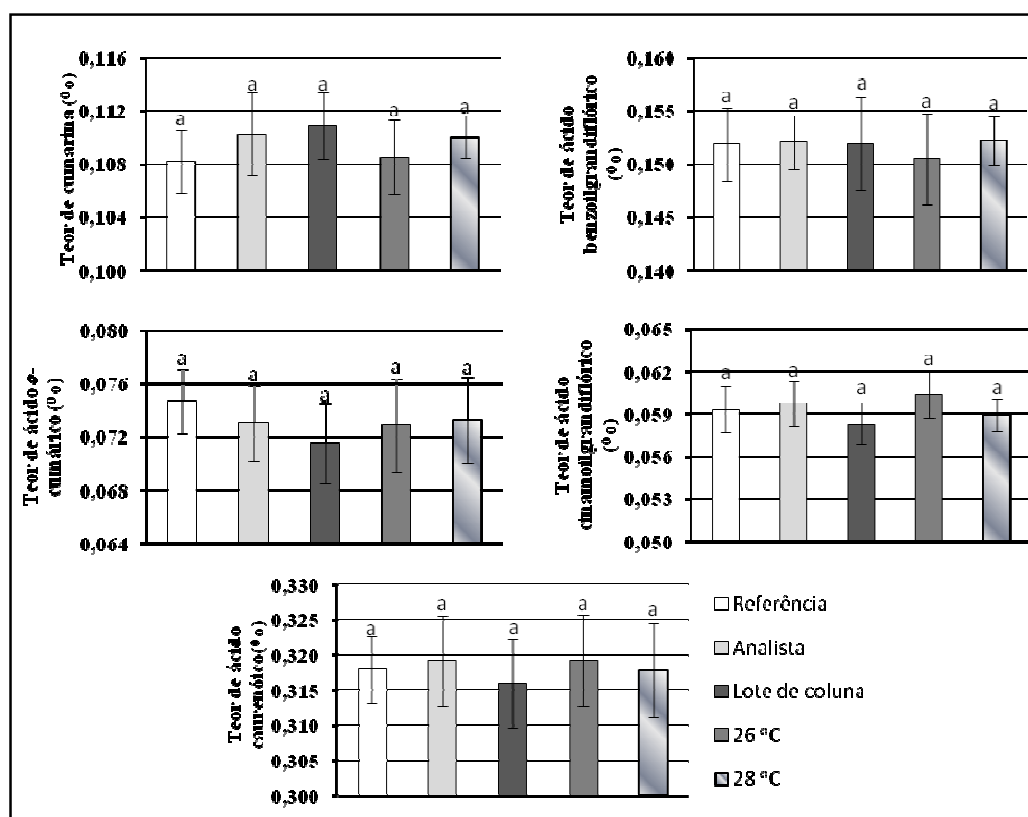


Figura 42. Influência de analistas, lote de coluna e temperatura na robustez do método para quantificação de marcadores químicos em folhas *M. laevigata* (média, $n = 6$). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os dados da análise de variância e do teste de Tukey indicaram não haver diferenças estatísticas dos resultados ($p > 0,05$), assegurando a robustez do método frente a pequenas variações nas condições analíticas estabelecidas, sem comprometer a confiabilidades dos resultados (BERTOLUCCI *et al.*, 2009).

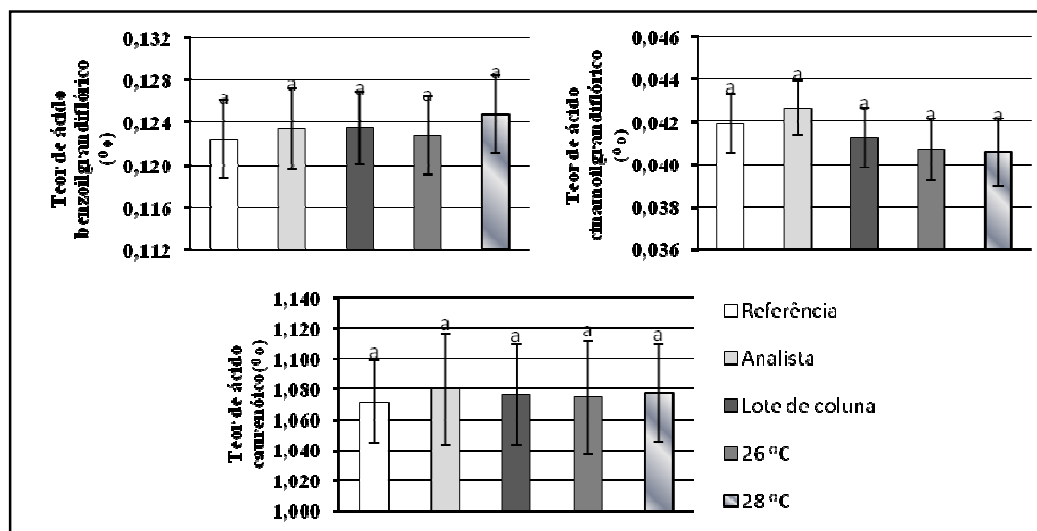


Figura 43. Influência de analistas, lote de coluna e temperatura na robustez do método para quantificação de marcadores químicos em folhas *M. glomerata* (média, $n = 6$). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

4.7 VARIAÇÃO SAZONAL DOS TEORES DE MARCADORES QUÍMICOS EM FOLHAS DE *M. laevigata* E *M. glomerata*, CULTIVADAS EM TRÊS NÍVEIS DE SOMBREAMENTO

Espécimens de *M. laevigata* e de *M. glomerata* foram cultivados sob três níveis de interceptação da radiação solar (0%, 40% e 80% de sombreamento), empregando malhas termo-refletoras Aluminet® (item 4.6). O material vegetal foi coletado e beneficiado conforme descrito no item 4.9.6. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.9.5.2 e as determinações quantitativas dos marcadores químicos foram realizadas empregando-se o método por CLAE-DAD desenvolvido e validado (item 5.5). Os teores dos marcadores químicos nas amostras foram calculados usando fator de resposta (SNYDER *et al.*, 1997).

Os teores calculados para cada marcador ($n = 6$) foram submetidos à análise de variância pelo teste de F ($p < 0,05$). Foi empregado o esquema em parcelas subdivididas no tempo, em que o sombreamento foi estudado na parcela e as estações do ano na subparcela. A

subparcela constou, também, da interação do sombreamento × estações, para verificar possível influência de um fator sobre o outro. Quando tal interação foi significativa procedeu-se ao desdobramento da parcela (sombreamento) dentro das subparcelas (estações) pela análise de variância pelo teste de F ($p < 0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Quando a interação não foi significativa, as médias dos tratamentos para dados qualitativos (estações do ano) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), enquanto aquelas para dados quantitativos (sombreamento) foram submetidos à análise de regressão.

Os resultados das análises mostraram diferenças marcantes entre as espécies, as épocas de colheita e os ambientes de cultivo para os derivados do ácido cinâmico. O ácido *o*-cumárico foi detectado em *M. laevigata*, mas em teor abaixo do limite de quantificação (< 0,045 %) estabelecido para o método, e somente nas plantas cultivadas sob 80% de sombreamento e coletadas no outono. Por outro lado, o ácido *o*-cumárico e a cumarina não foram detectados nas amostras analisadas de *M. glomerata*.

Diversos autores relataram a presença de cumarina em *M. glomerata*, com teores nas folhas secas compreendidos na faixa entre 0,02 e 1,59%, empregando diversos métodos para quantificação (Tabela 1, pág37) (OLIVEIRA *et al.*, 1984; VILEGAS *et al.*, 1997b; SANTOS *et al.*, 1998; VENEZIANI; OLIVEIRA, 1999; CELEGHINI *et al.*, 1999; ABOY *et al.*, 2000; CABRAL *et al.*, 2001; CELEGHINI *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2003; BIAVATTI *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2006). Por outro lado, Rehder *et al.* (2000b) ao avaliar acessos de *Mikania* coletados em diferentes regiões do estado de São Paulo relataram quatro espécimens de *M. laevigata* com teores de cumarina entre 1,10 e 2,61%, e três indivíduos de *M. glomerata* para os quais não foi detectada a cumarina, resultado semelhante ao obtido no presente trabalho.

Tendo em vista que a identidade botânica da espécie *M. glomerata* em estudo foi confirmada por diferentes especialistas e, portanto, a incorreção da classificação botânica está descartada, pode-se supor que acessos distintos de *M. glomerata* seriam responsáveis pela ausência de cumarina nos indivíduos estudados.

Com relação aos teores de cumarina em *M. laevigata* determinados no presente trabalho, observou-se variação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para os níveis de sombreamento, estações do ano, bem como para a interação desses fatores (Tabela 47). As tabelas de análise de variância para a cumarina apresentadas a seguir (Tabelas 47 e 48)

exemplificam como os dados foram tratados estatisticamente, quando houve significância estatística para as variáveis de respostas.

Tabela 47. Análise de variância dos teores de cumarina em folhas de *M. laevigata* coletadas em diferentes épocas do ano e cultivadas sob três níveis de interceptação da radiação solar.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
SOMBREAMENTO	2	0.204344	0.102172	15.009	0.0003*
erro 1	15	0.102110	0.006807		
ESTAÇÃO	3	3.381333	1.127111	132.371	0.0000*
ESTAÇÃO*SOMBREAMENTO	6	1.077666	0.179611	21.094	0.0000*
erro 2	45	0.383165	0.008515		
Total corrigido	71	5.148618			

* Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Tabela gerada a partir do *software* Sisvar[®], versão 5.0 (Ferreira, 2007).

O desdobramento dos níveis de irradiância dentro das épocas do ano mostrou que houve efeito significativo do sombreamento nas estações inverno e verão, não sendo significativo para o outono e a primavera, pelo teste F ($p < 0,05$) (Tabela 48).

Tabela 48. Análise de variância do desdobramento dos níveis de sombreamento dentro das estações do ano para os teores de cumarina em folhas de *M. laevigata*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
SOMBREAMENTO/INVERNO	2	0.136434	0.068217	8.012	0.0010*
SOMBREAMENTO/OUTONO	2	0.012725	0.006362	0.747	0.4757
SOMBREAMENTO/PRIMAVERA	2	0.034421	0.017210	2.021	0.1415
SOMBREAMENTO/VERÃO	2	1.098431	0.549216	64.502	0.0000*
Resíduo	45	0.383165	0.008515		

* Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Tabela gerada a partir do *software* Sisvar[®], versão 5.0 (Ferreira, 2007).

O maior teor de cumarina ($0,94 \pm 0,24$ %) foi observado para as amostras do verão cultivadas sob 80% de sombreamento. No entanto, ao contrário do verão, no inverno o teor de cumarina é tanto maior ($0,24 \pm 0,09$ %) quanto menor o sombreamento (Figura 44). Esses resultados sugerem que a estação do ano e a incidência de radiação solar são determinantes para a produção desse metabólito em *M. laevigata*.

O reduzido nível de irradiância (20%) somado às condições climáticas do verão, que apresentou alto índice de precipitação (227 mm) durante a realização do experimento (Tabela 49), forneceram condições semelhantes ao habitat natural de *M. laevigata*, que é adaptada a climas sem deficiência hídrica e com baixa luminosidade (6%) (ANTONACIO; WISINIEWSKI, 1998).

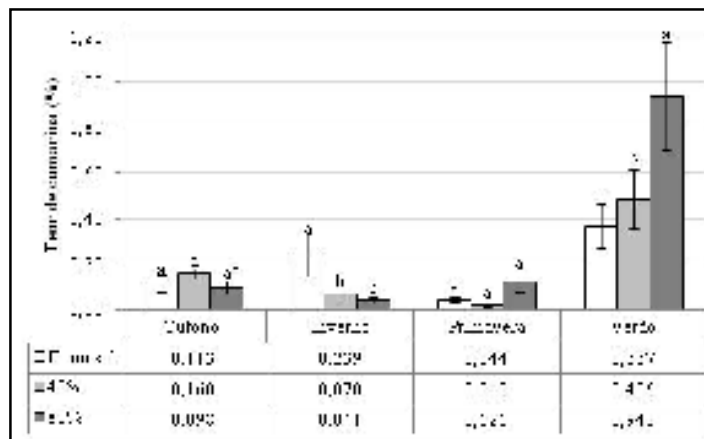


Figura 44. Variação sazonal e do cultivo sob diferentes níveis de sombreamento nos teores médios (%) de cumarina em folhas de *M. laevigata*. As médias seguidas de mesma letra dentro de cada estação não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$) ($n = 6$).

Tabela 49. Dados meteorológicos médios durante o período do estudo de variação sazonal de metabólitos em *M. laevigata* e *M. glomerata*.

Estação	Temp. máx. (°C)	Temp. mín. (°C)	Temp. média (°C)	Prec. total (mm)	UR (%)	Insol. (h)
Outono	28,5	16,0	21,2	33,8	69,7	7,9
Inverno	26,2	11,3	17,8	7,8	62,7	8,5
Primavera	29,2	16,0	21,7	80,2	62,3	7,5
Verão	28,6	17,8	22,2	227,6	77,0	6,1

Fonte: Estação climatológica do Departamento de Engenharia Agrícola/UFLA. **Legenda:** **Temp. máx.:** temperatura máxima; **Temp. mín.:** temperatura mínima; **Temp. média:** temperatura média; **Prec. total:** precipitação total; **UR:** umidade relativa do ar; **Insol.:** insolação.

Independente do nível de sombreamento estudado, observou-se que no verão os teores de cumarina são estatisticamente superiores às demais estações (Figura 45). Esse resultado sugere que, além das condições ambientais favoráveis, o estágio fisiológico da planta também contribui para o aumento dos teores de cumarina nesse período.

No verão, *M. laevigata* encontra-se em pleno desenvolvimento vegetativo, caracterizado por biomassa abundante, especialmente de folhas jovens. Os maiores teores de cumarina observados nessa época do ano podem estar diretamente relacionados à proporção de folhas jovens nas amostras analisadas, corroborando os resultados relatados por Pereira *et al.* (2000) e Castro *et al.*, (2006), que quantificaram concentrações de cumarina cerca de três vezes maiores em folhas jovens de *M. glomerata* em comparação com folhas maduras.

Ao avaliar os teores de cumarina nas plantas de *M. laevigata* cultivadas a pleno sol, os maiores teores observados foram nas estações verão ($0,37\% \pm 0,10\%$) e inverno ($0,24\% \pm$

0,09 %) (Figura 45). Esses resultados são condizentes com os relatados por Pereira *et al.* (2000), que observaram teores máximos de cumarina de 0,24% e 0,29%, respectivamente no verão e no inverno.

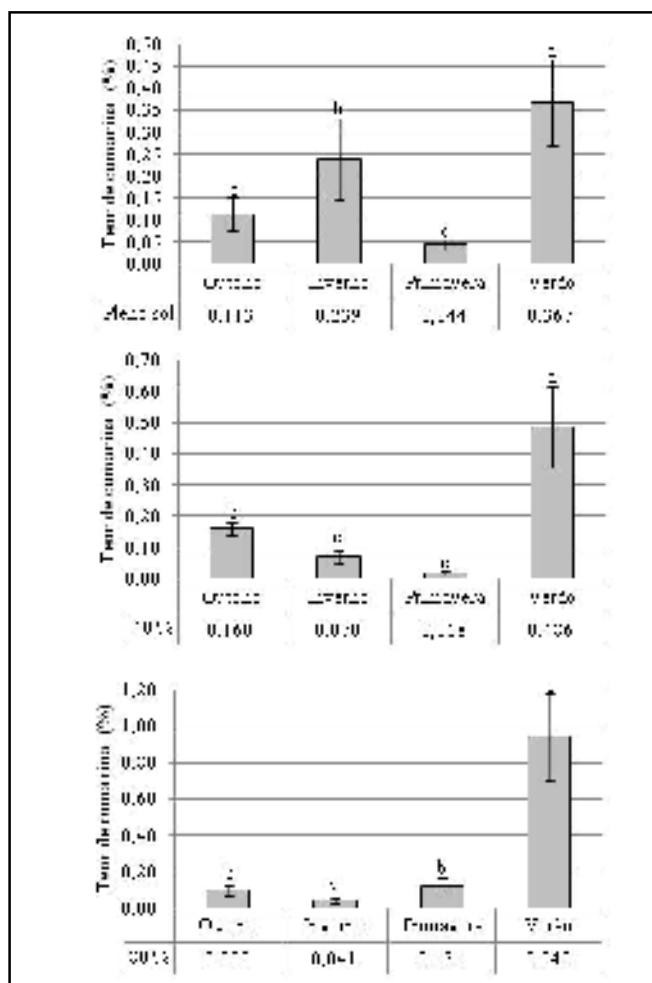


Figura 45. Teores (%) sazonais de cumarina em folhas de *M. laevigata* cultivadas sob diferentes níveis de sombreamento. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) ($n = 6$).

Luz e temperatura são fatores ambientais intimamente relacionados à atividade fotossintética (TAIZ; ZEIGER, 2004). O segundo maior teor obtido de cumarina, em *M. laevigata* cultivada a pleno sol, foi no inverno. Esse resultado sugere que o fator temperatura também pode ter influenciado a síntese desse metabólito secundário. Vários estudos sobre a influência dos níveis de sombreamento no cultivo de espécies vegetais não são conclusivos se o benefício do sombreamento é resultante da diminuição da incidência de luz ou da redução

da temperatura (ALVARENGA *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2007b; POLYSACK..., 2008).

As telas termo-refletoras Aluminet® refletem as ondas de calor reduzindo a temperatura em cerca de 10 a 20%. A diminuição da temperatura faz com que ocorra aumento da umidade relativa, com conseqüente redução da necessidade de irrigação e nebulização (POLYSACK..., 2008).

No presente estudo, as plantas cultivadas sob a malha termo-refletora, certamente foram submetidas a uma temperatura média inferior àquela do ambiente a pleno sol (temp. média do ar 17,9 °C), e isto pode ter contribuído para a limitada síntese desse metabólito nos ambientes protegidos de radiação durante o inverno.

Por outro lado, o excesso de luz e temperatura pode suprimir o metabolismo de carbono pela saturação das taxas fotossintéticas e indução de injúrias oxidativas ao aparelho fotossintético (KISLYUK *et al.*, 2004). Durante o verão, quando o clima é caracterizado por temperaturas elevadas (Temp. média do ar 22,2 °C), as plantas cultivadas sob a malha termo-refletora, que fornece temperatura mais amena, estariam protegidas de superaquecimento durante o dia. Como *M. laevigata* é uma espécie encontrada, naturalmente, no interior de matas, o nível de sombreamento de 80% pode ter favorecido as taxas fotossintéticas por proteger o aparelho fotossintético contra a radiação solar excessiva e, conseqüentemente, induziu o aumento dos teores de cumarina. Entretanto, respostas conclusivas sobre essas suposições só poderão ser obtidas por estudos de ecofisiologia vegetal relacionados à síntese de metabólitos secundários.

Os resultados do estudo da variação sazonal de diterpenos caurânicos também foram consideravelmente distintos entre as espécies. *M. laevigata* apresentou maiores teores dos ácidos benzoilgrandiflórico e cinamoilgrandiflórico no cultivo a pleno sol independente da época do ano, sendo que nos cultivos sob sombreamento seus teores variaram conforme a estação do ano. Já o ácido caurenóico foi o diterpeno mais abundante em *M. glomerata*, independentemente da estação do ano e do nível de irradiância.

A análise de variância dos dados obtidos para o ácido benzoilgrandiflórico em *M. laevigata* revelou que os níveis de sombreamento, as estações do ano, bem como a interação desses fatores alteraram significativamente os teores desse metabólito ($p < 0,05$). Considerando o desdobramento dos níveis de sombreamento dentro das épocas do ano, observou-se efeito estatisticamente significativo do sombreamento dentro das estações ($p < 0,05$). Em todas as estações do ano, o maior teor de ácido benzoilgrandiflórico ocorreu nas

plantas de *M. laevigata* cultivadas a pleno sol, com exceção do verão, onde as plantas cultivadas no nível de 40% de sombreamento também apresentaram teores elevados, sendo o teor estatisticamente equivalente àquela da condição a pleno sol (Figura 46). Não se observou variação sazonal nos teores do ácido benzoilgrandiflórico na condição a pleno sol (Figura 47).

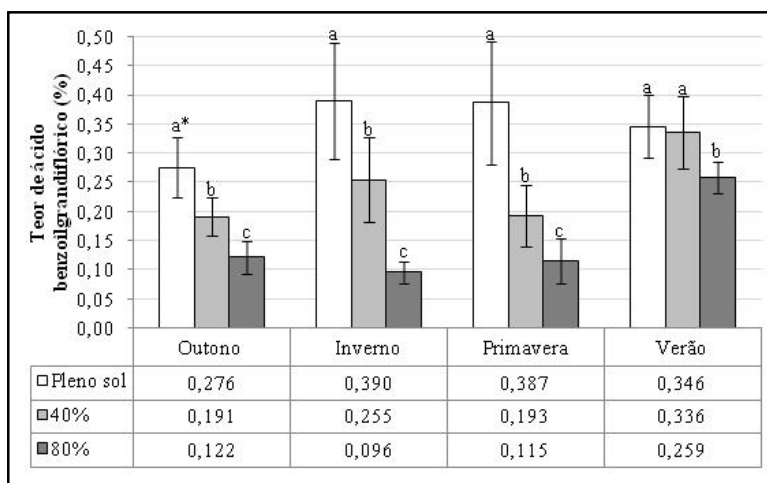


Figura 46. Variação sazonal e do cultivo sob diferentes níveis de sombreamento nos teores médios (%) de ácido benzoilgrandiflórico em folhas de *M. laevigata*. As médias seguidas de mesma letra dentro das estações do ano não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) ($n = 6$).

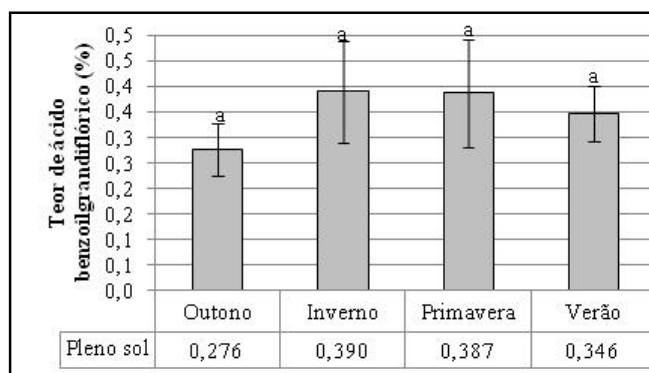


Figura 47. Teores (%) sazonais de ácido benzoilgrandiflórico nas folhas de *M. laevigata*, cultivadas a pleno sol. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) ($n = 6$).

Os teores do ácido benzoilgrandiflórico em folhas de *M. glomerata* apresentaram comportamento distinto de *M. laevigata*, frente aos ambientes de cultivo e a variação sazonal. Na primeira espécie, os teores desse marcador foram afetados pelos níveis de sombreamento e pelas estações do ano ($p < 0,05$), mas diferente do que foi observado na segunda, não foi afetado pela interação de ambos os fatores ($p > 0,05$) (Tabela 50). A tabela de análise de

variância para o ácido benzoilgrandiflórico em *M. glomerata* é apresentada a seguir para exemplificar o tratamento estatístico dos dados, quando não houve significância na interação sombreamento \times estações.

Tabela 50. Análise de variância dos teores de ácido benzoilgrandiflórico em folhas de *M. laevigata* coletadas em diferentes épocas do ano e cultivadas sob três níveis de interceptação da radiação solar.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
SOMBREAMENTO	2	0.010863	0.005431	3.880	0.0438*
erro 1	15	0.020995	0.001400		
ESTAÇÃO	3	0.026525	0.008842	9.369	0.0001*
ESTAÇÃO*SOMBREAMENTO	6	0.009414	0.001569	1.663	0.1524
erro 2	45	0.042469	0.000944		
Total corrigido	71	0.110265			

* Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Tabela gerada a partir do *software* Sisvar[®], versão 5.0 (Ferreira, 2007).

O fato da interação estação \times sombreamento não ter sido estatisticamente significativa para a variação do teor do ácido benzoilgrandiflórico implica que o sombreamento não depende das estações, sendo o inverno a estação que proporciona maior teor desse marcador, independentemente do nível de sombreamento estudado. Com relação à influência do sombreamento no teor do ácido benzoilgrandiflórico em *M. glomerata*, observou-se uma resposta quadrática melhor evidenciada durante o verão e o inverno, com teores máximos de $0,21 \pm 0,01$ e $0,26 \pm 0,07\%$, respectivamente, no cultivo sob 40% de sombreamento. Com o aumento no nível de sombreamento os teores de ácido benzoilgrandiflórico tenderam a decrescer (Figura 48). No que se refere aos teores máximos de ácido benzoilgrandiflórico em ambas as espécies, *M. laevigata* apresentou teor cerca de duas vezes maior ($0,39 \pm 0,10 \%$) do que o observado em *M. glomerata* ($0,23 \pm 0,03\%$).

Os teores do ácido cinamoilgrandiflórico apresentaram comportamento inverso ao observado para o ácido benzoilgrandiflórico nas espécies. Em *M. laevigata*, o teor desse metabólito foi influenciado significativamente pelos níveis de sombreamento, bem como pelas estações do ano ($p < 0,05$), mas não foi afetado pela interação de ambos os fatores ($p > 0,05$). Em *M. glomerata*, observou-se efeito significativo para todas as variáveis de respostas, inclusive para a interação entre elas ($p < 0,05$).

O estudo da variação do teor de ácido cinamoilgrandiflórico em *M. laevigata* revelou que esse constituinte apresenta comportamento linear, decrescente à medida que o nível de luz diminui. O seu maior teor ocorreu durante o verão, sendo estatisticamente diferente às demais

estações, as quais apresentaram significância estatística equivalente (Figura 49).

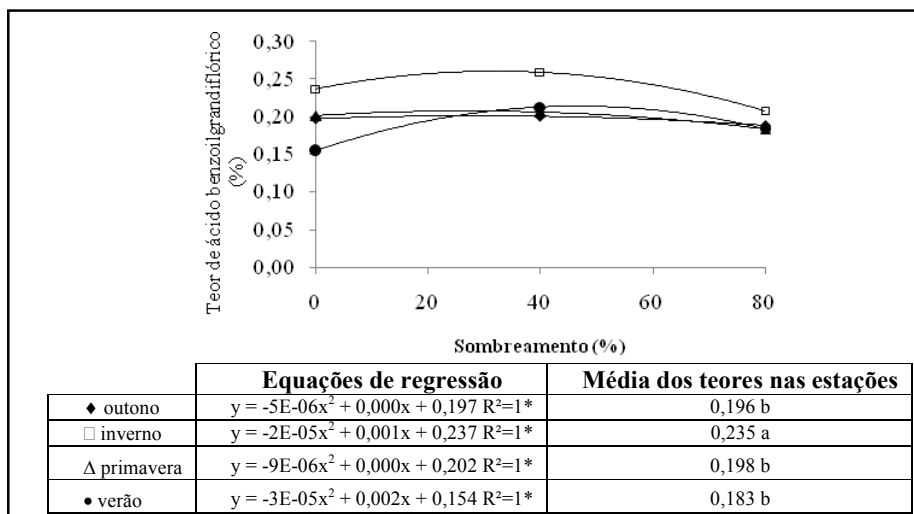


Figura 48. Variação sazonal e do cultivo sob diferentes níveis de sombreamento nos teores médios (%) de ácido benzoilgrandiflórico em folhas de *M. glomerata*. As médias dos teores nas estações seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) ($n = 6$). *Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

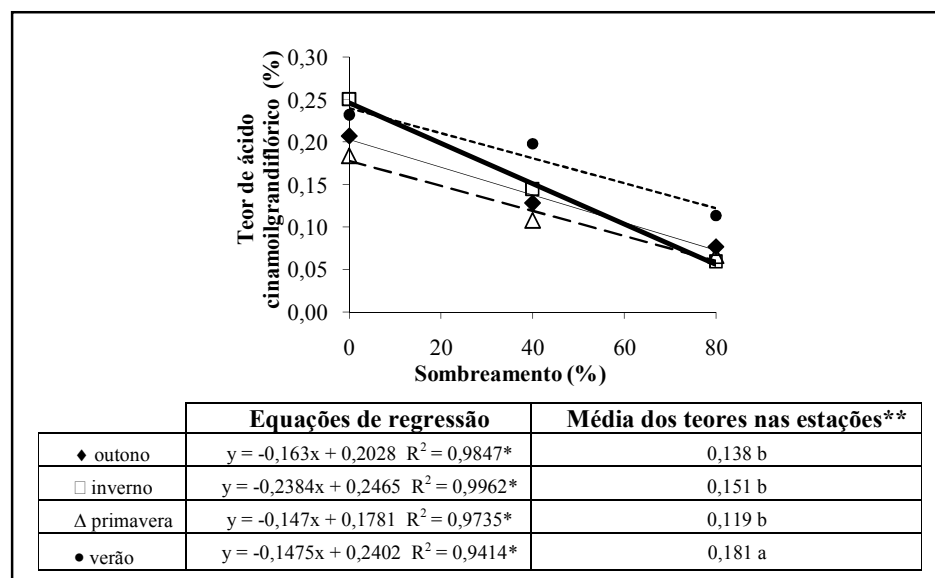


Figura 49. Variação sazonal e do cultivo sob diferentes níveis de sombreamento nos teores médios (%) de ácido cinamoilgrandiflórico em folhas de *M. laevigata*. As médias dos teores nas estações seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) ($n = 6$). *Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Em *M. glomerata*, observou-se efeito do sombreamento apenas no inverno; em

contrapartida, as demais estações não mostraram significância pelo teste F ($p < 0,05$) (Figura 50).

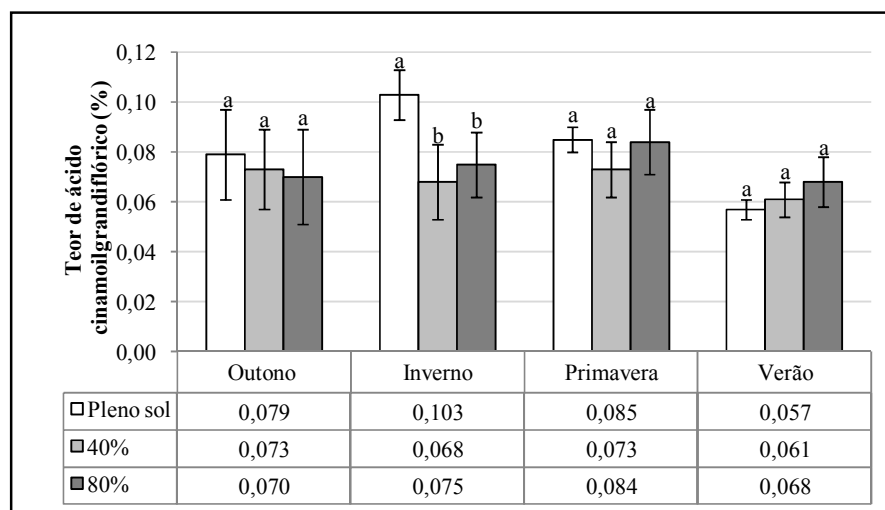


Figura 50. Variação sazonal e do cultivo sob diferentes níveis de sombreamento nos teores médios (%) de ácido cinamoilgrandiflórico em folhas de *M. glomerata*. As médias seguidas de mesma letra entre as estações, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) ($n = 6$).

Na condição a pleno sol, observou-se flutuação dos teores de ácido cinamoilgrandiflórico em *M. glomerata* durante as estações do ano. O teor máximo ocorre no inverno ($0,10 \pm 0,01\%$), havendo redução estatisticamente significativa na primavera ($0,08 \pm 0,005\%$) e no verão ($0,06 \pm 0,004\%$), voltando a elevar no outono ($0,08 \pm 0,02\%$) (Figura 51).

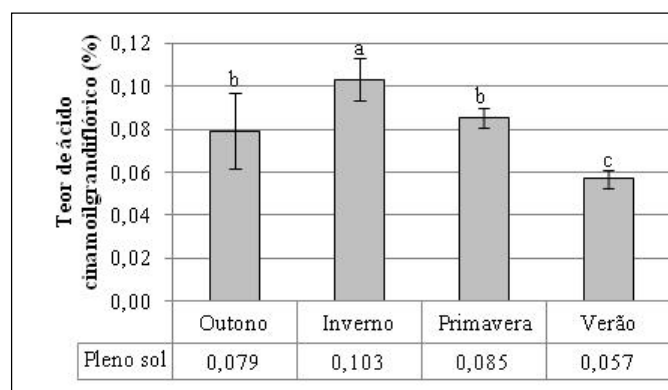


Figura 51. Teores (%) sazonais de ácido cinamoilgrandiflórico nas folhas de *M. glomerata*, cultivadas a pleno sol. As médias seguidas de mesma letra entre as estações do ano, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) ($n = 6$).

Para o ácido caurenóico, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p <$

0,05) para os níveis de sombreamento, as estações do ano e para a interação desses fatores nas duas espécies. Em *M. laevigata*, o teor máximo de ácido caurenóico ocorreu nas plantas cultivadas a pleno sol, com exceção do verão, onde as plantas cultivadas sob 40% de sombreamento também apresentaram teor elevado e, estatisticamente, equivalente à condição a pleno sol (Figura 52A). No inverno, o teor do ácido caurenóico foi menor quanto maior o nível de sombreamento. No outono e na primavera, embora se observe uma tendência de queda, não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de 40 e 80% de sombreamento.

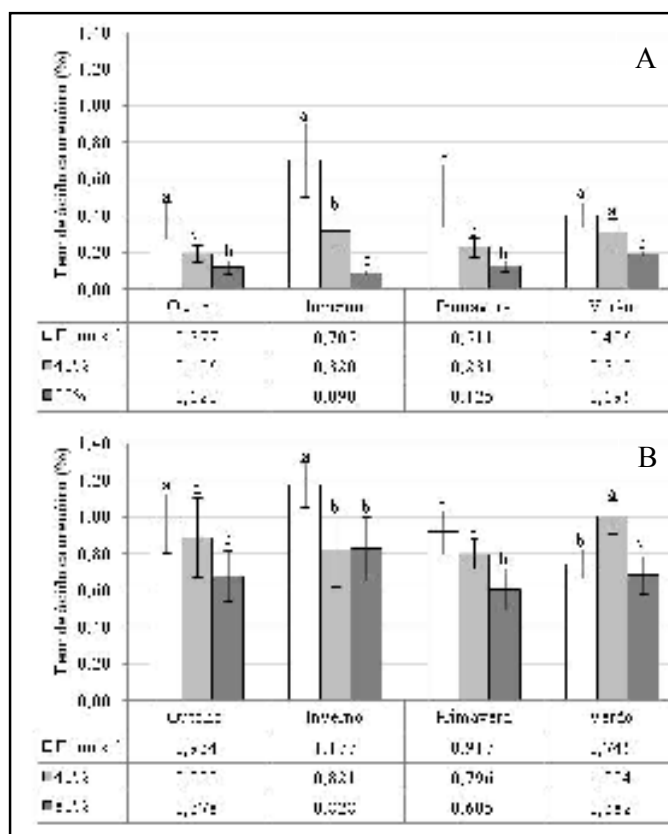


Figura 52. Variação sazonal e do cultivo sob diferentes níveis de sombreamento nos teores médios (%) de ácido caurenóico em folhas de *M. laevigata* (A) e *M. glomerata* (B). As médias dos teores nas estações seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) ($n = 6$).

Os teores de ácido caurenóico em *M. glomerata*, de maneira semelhante àqueles em *M. laevigata*, também foram maiores na condição de cultivo a pleno sol, com exceção do verão. Entretanto, no outono e na primavera os teores nas plantas cultivadas sob 40% de sombreamento não diferiram estatisticamente da condição a pleno sol ($p > 0,05$). No verão, o teor máximo desse constituinte foi observado nas plantas cultivadas sob 40% de

sombreamento. Em todas as estações, os teores mínimos de ácido caurenóico foram observados nas plantas cultivadas sob 80% de sombreamento, não sendo estatisticamente diferentes dos teores no inverno sob 40% de sombreamento e no verão a pleno sol (Figura 52B).

A avaliação sazonal de *M. laevigata* e *M. glomerata* cultivadas sob pleno sol indicou maior produção de ácido caurenóico no inverno. Em *M. glomerata* cultivada sob sombreamento (40 e 80%), a produção de ácido caurenóico foi independente da estação. Já em *M. laevigata* durante o verão, nos dois níveis de sombreamentos estudados, e no inverno, para o nível de 40% de sombreamento, apresentaram os maiores teores desse constituinte (Figura 53).

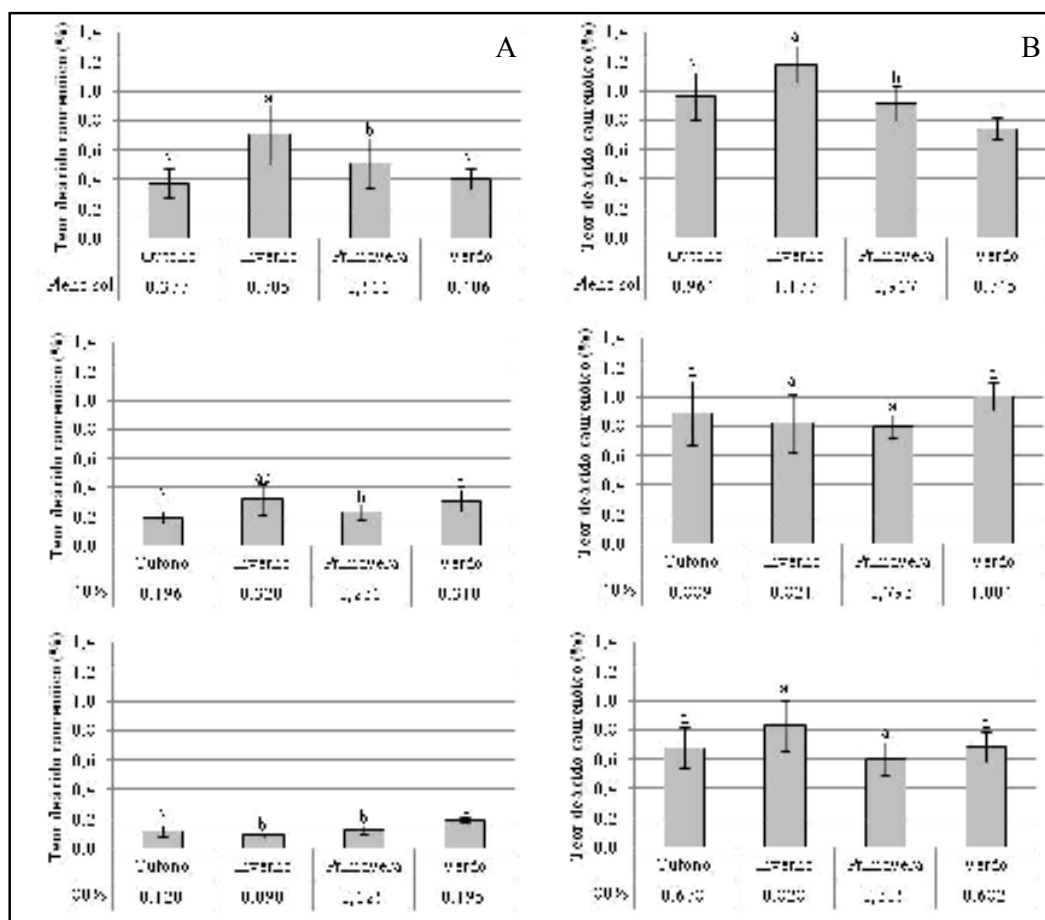


Figura 53. Teores (%) sazonais de ácido caurenóico nas folhas de (A) *M. laevigata* e (B) *M. glomerata*, cultivadas sob diferentes níveis de sombreamento. Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) ($n = 6$).

M. laevigata e *M. glomerata* são espécies encontradas em habitats característicos de borda ou interior de mata (RITTER; WAECHTER, 2004). Embora no presente trabalho não se tenha avaliado o teor de constituintes químicos em relação ao crescimento vegetativo das plantas, observou-se maior vigor vegetativo (maior produção de biomassa) das plantas cultivadas sob níveis de sombreamento do que aquelas cultivadas a pleno sol, em todas as estações do ano.

Os resultados mostraram que o teor da cumarina é fortemente afetado pela variação sazonal e pelo nível de sombreamento nas plantas de *M. laevigata*. A produção de cumarina, em todas as condições de radiação estudadas, é mais pronunciada no verão, e é drasticamente aumentada em plantas cultivadas sob elevado nível de sombreamento.

No que se refere aos diterpenos caurânicos, com exceção do ácido benzoilgrandiflórico em *M. glomerata*, de maneira geral observaram-se maiores teores nas plantas cultivadas sob radiação solar plena. A biossíntese de diterpenos ocorre pela via cloroplastídica DOXP/MEP (1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato/2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato), a partir dos intermediários da via glicolítica, ácido pirúvico e 3-fosfogliceraldeído (LICHTENTHALER, 1999). A via DOXP/MEP opera eficientemente sob altas irradiâncias (LICHTENTHALER, 2007). Esse mesmo autor relatou que folhas de plantas cultivadas sob alta incidência de luz possuem cloroplastos “*tipo-sol*”, adaptados a altas taxas de assimilação fotossintética de CO₂ e de pigmentos fotossintetizantes, quando comparadas com folhas cultivadas na sombra. Tendo em vista esses relatos, pode-se supor que os maiores teores de diterpenos observados nas plantas cultivadas a pleno sol, no presente estudo, sejam resultantes do aparato fotossintético que se adaptou favoravelmente ao excesso de luz, levando ao incremento na produção dos diterpenos.

Em suma, os resultados obtidos indicam que *M. laevigata* necessita de cultivo protegido sob Aluminet[®] 80% para maximizar os teores de cumarina, à custa da diminuição dos teores de diterpenos caurânicos, sendo a colheita realizada preferencialmente no verão. *M. glomerata* deve ser cultivada sob radiação solar plena e suas folhas coletadas no inverno para obtenção de material vegetal com maiores teores de diterpenos caurânicos.

Considerando os resultados obtidos no que tange a prática agrônômica e a recomendação de teor mínimo de 0,1% de cumarina pela Farmacopéia Brasileira IV, recomenda-se o cultivo das espécies de guaco no ambiente a pleno sol, a fim de reduzir os custos de produção, e sua colheita realizada nas estações inverno e verão, cujos teores obtidos

foram respectivamente de 0,24 e 0,37%. Para obtenção de maiores rendimentos de cumarina recomenda-se o cultivo consorciado com espécies arbóreas.

Existem fortes evidências de que a cumarina e diterpenos caurânicos são responsáveis pelos efeitos farmacológicos dessas espécies (LEITE *et al.*, 1993; MOURA *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2006; AMBROSIO *et al.* 2006). A determinação de técnicas de manejo agrícola e da época de colheita que proporcione maximização dos teores desses marcadores químicos contribuirá para a padronização de extratos dessas plantas e de suas fitopreparações.

5.8 ESTABILIDADE QUÍMICA DOS MARCADORES QUÍMICOS NAS DROGAS VEGETAIS *M. laevigata* E *M. glomerata* DURANTE ARMAZENAMENTO

A integridade química da droga vegetal foi monitorada a partir da quantificação dos teores dos derivados do ácido cinâmico (cumarina e ácido *o*-cumárico) e diterpenos caurânicos (ácidos benzoilgrandiflórico, cinamoilgrandiflórico e caurenóico), durante o armazenamento de amostras de folhas secas de *M. laevigata* e *M. glomerata*.

O material vegetal foi cultivado, colhido, beneficiado e armazenado conforme descrito no item 4.9.7. *M. glomerata* e *M. laevigata* foram armazenadas por um período máximo de 12 e 18 meses. Os estudos com *M. glomerata* foram interrompidos aos 12 meses porque sua continuação não era justificada, já que a instabilidade dos derivados caurânicos foi demonstrada a partir do terceiro mês de armazenamento da droga vegetal.

Durante todo período avaliado (12 meses), a cumarina (**33**) e o ácido *o*-cumárico (**42**) não foram detectados nos perfis cromatográficos de *M. glomerata* (Figura 54), enquanto apenas **33** estava presente em *M. laevigata* (Figura 55). Entretanto, análises da pureza espectral do pico correspondente a **33** acusaram a presença de substância co-eluída com este, a partir do sexto mês de armazenamento.

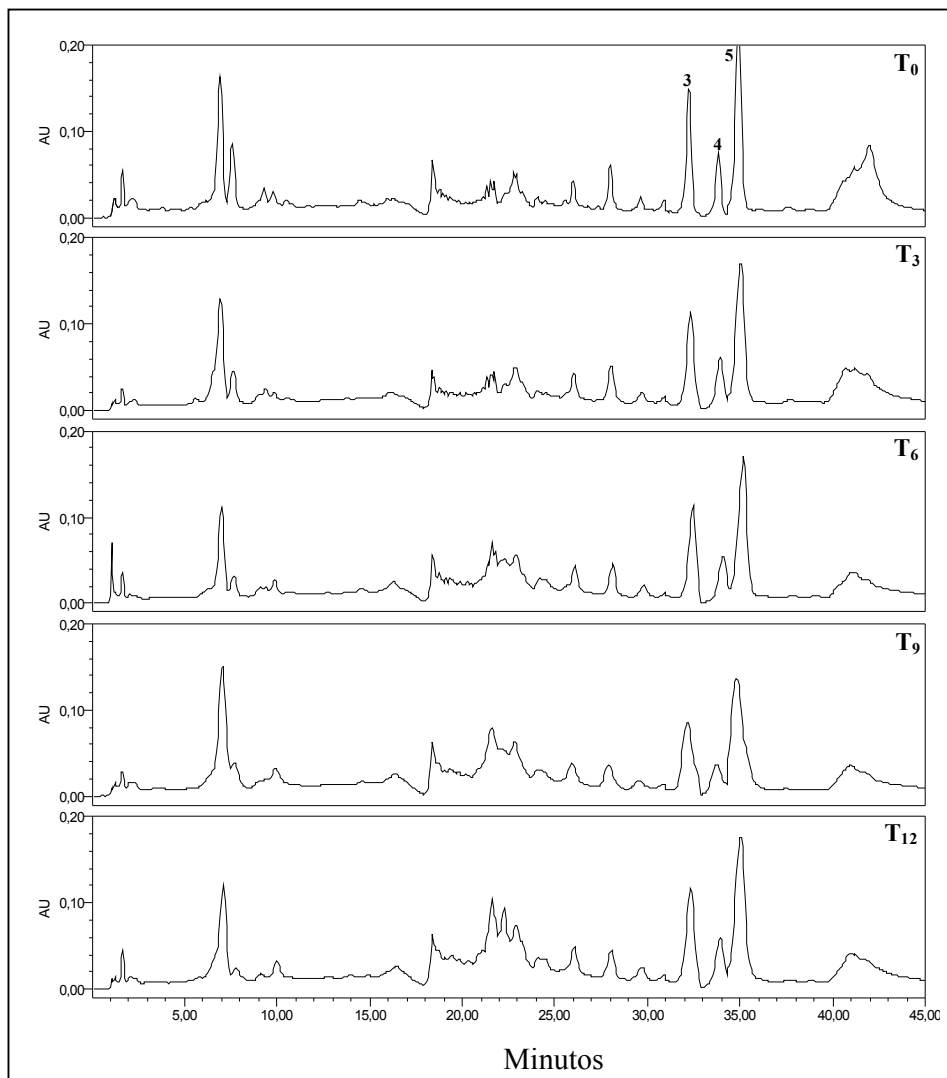


Figura 54. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para o extrato etanólico de folhas de *M. glomerata* durante armazenamento para avaliação de estabilidade de marcadores químicos. **Condição cromatográfica:** vide Parte Experimental, item 4.9.5.1. **Programa de detecção:** 0-30 min: 210 nm; 31,0-32,4 min: 230 nm; 32,5-34,0 min: 270 nm; 34,1-38,0: 210 nm. **Picos:** 3, ácido benzoilgrandiflórico; 4, ácido cinamoilgrandiflórico; 5, ácido caurenóico. **Legenda:** T₀, tempo inicial do estudo; T₃, 3 meses; T₆, 6 meses; T₉, 9 meses; T₁₂, 12 meses; T₁₅, 15 meses e T₁₈, 18 meses de armazenamento.

Os espectros no ultravioleta obtidos *on-line* pelo detector de DAD na base ascendente e descendente do pico correspondente a **33** evidenciaram a presença de um produto de decomposição formado durante a estocagem da droga vegetal (Figura 56).

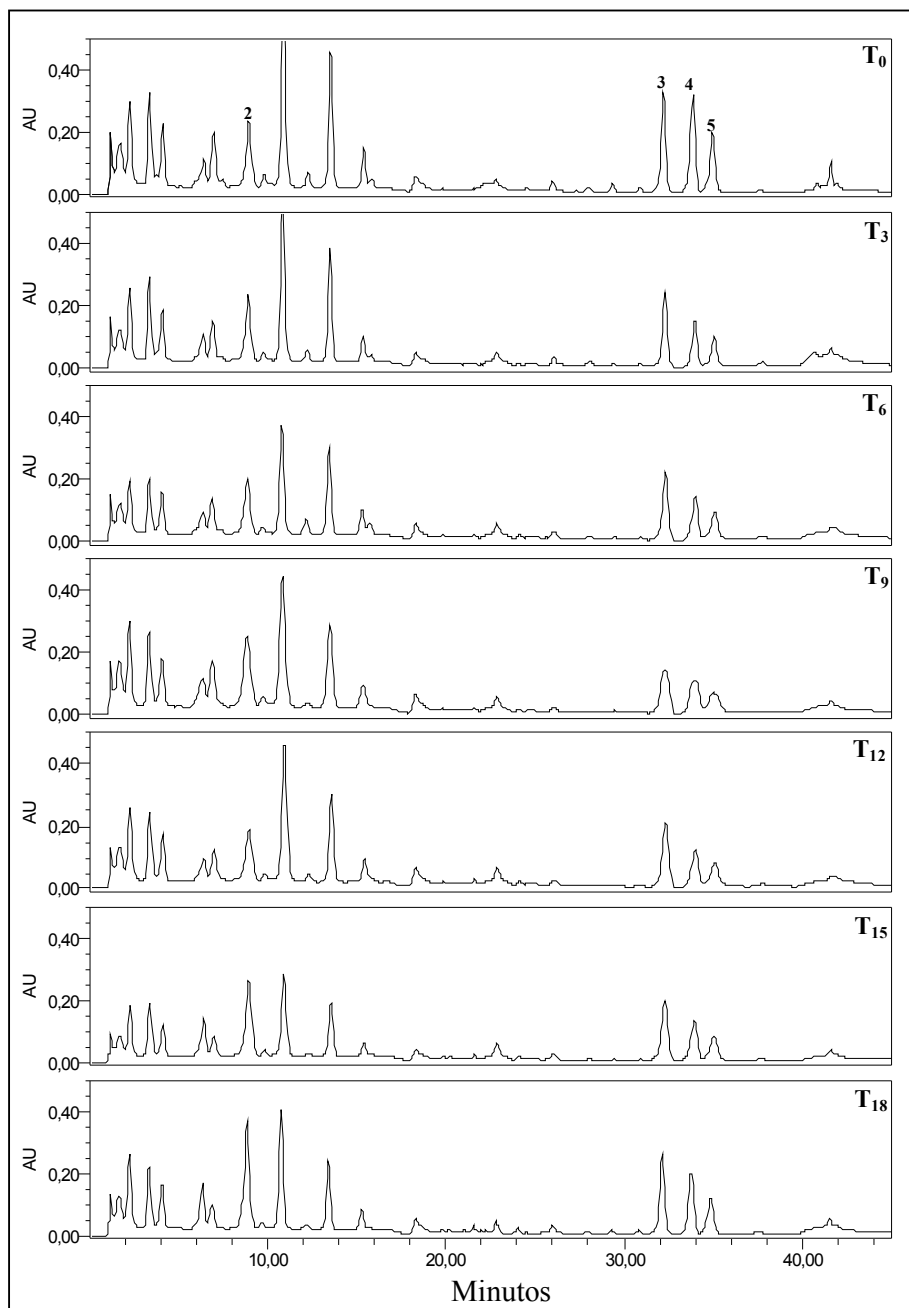
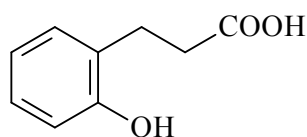


Figura 55. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para o extrato etanólico de folhas de *M. laevigata* durante armazenamento para avaliação de estabilidade de marcadores químicos. **Condição cromatográfica:** vide Parte Experimental, item 4.9.5.1. **Programa de detecção:** 0-30 min: 210 nm; 31,0-32,4 min: 230 nm; 32,5-34,0 min: 270 nm; 34,1-38,0: 210 nm. **Picos:** 2, cumarina; 3, ácido benzoilgrandiflórico; 4, ácido cinamoilgrandiflórico; 5, ácido caurenóico. **Legenda:** T₀, tempo inicial do estudo; T₃, 3 meses; T₆, 6 meses; T₉, 9 meses; T₁₂, 12 meses; T₁₅, 15 meses e T₁₈, 18 meses de armazenamento.

O perfil espectral da impureza detectada na porção ascendente do pico é similar ao do ácido *o*-cumárico (**42**) (Figura 56); porém, não é descartada a possibilidade de ser o ácido melilótico (**69**), que apresenta espectro no UV semelhante. Os ácidos *o*-cumárico e melilótico apresentam máximos de absorção espectral no ultravioleta de 274 nm em etanol (STOKER; BELLIS, 1962).



69

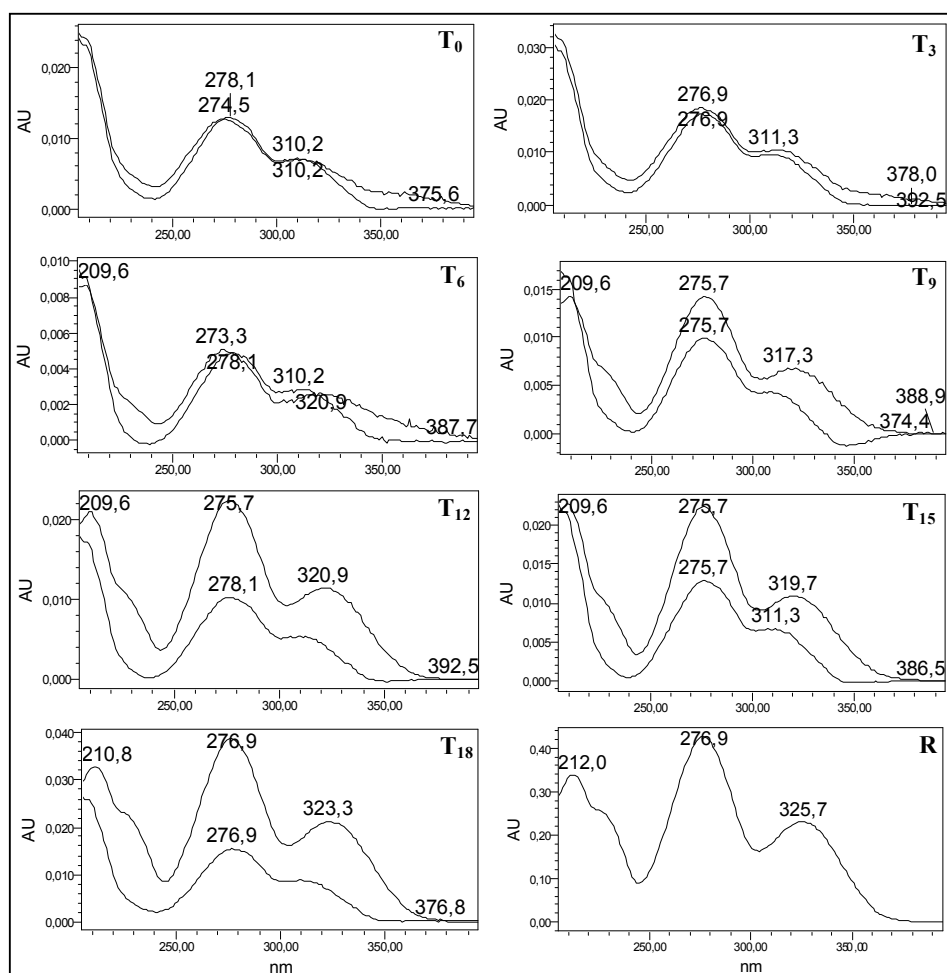


Figura 56. Espectros no ultravioleta registrados *on-line* pelo detector de DAD na porção ascendente e descendente do pico da cumarina nos cromatogramas da Figura 55. **Legenda:** T₀, tempo inicial do estudo; T₃, 3 meses; T₆, 6 meses; T₉, 9 meses; T₁₂, 12 meses; T₁₅, 15 meses e T₁₈, 18 meses de armazenamento. e **R**, ácido *o*-cumárico de referência.

A presença marcante do contaminante foi evidenciada nas amostras com 12 meses de armazenamento (Figura 56).

A quantificação da cumarina durante o período avaliado (18 meses) não mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) nos teores dessa substância (Figura 57). Esse fato pode ser explicado pela integração conjunta do pico da cumarina e do contaminante (42 ou 69).

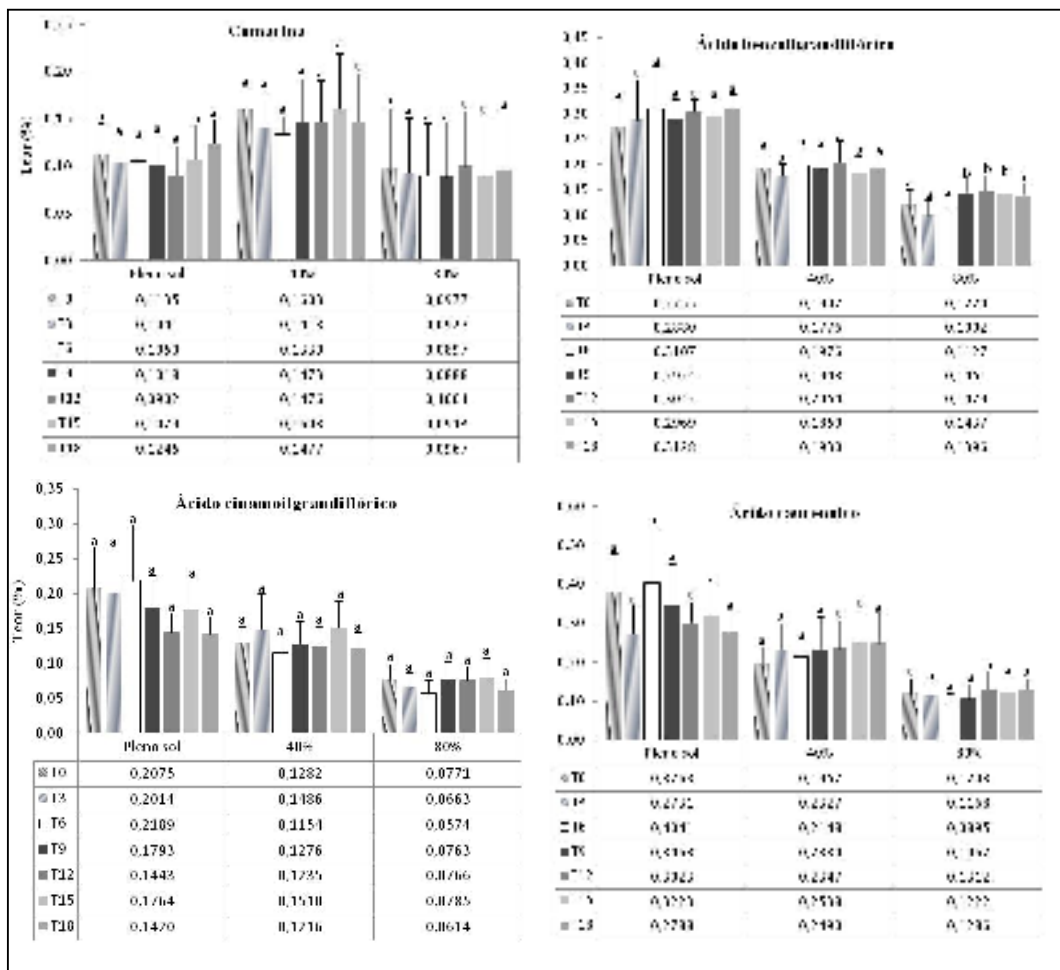


Figura 57. Teores médios (%) dos marcadores químicos em folhas de *M. laevigata* cultivadas sob diferentes níveis de sombreamento e armazenadas para avaliação de estabilidade de marcadores químicos. **Legenda:** T₀, tempo inicial do estudo; T₃, 3 meses; T₆, 6 meses; T₉, 9 meses; T₁₂, 12 meses; T₁₅, 15 meses e T₁₈, 18 meses de armazenamento. As médias seguidas de mesma letra nos diferentes níveis de sombreamento, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$) ($n = 6$).

A hipótese de degradação da cumarina por abertura do anel lactônico é respaldada por trabalhos anteriores, que demonstraram a conversão de cumarina em ácido melilótico, em folhas de *Melilotus alba* L. (trevo-branco) e folhas de *Melilotus officinalis* L (trevo-amarelo)

(STOKER; BELIS, 1972; KOSUGE; CONN, 1962; KOSUGE; CONN, 1959). A seqüência das transformações químicas propostas por esses autores está representada na Figura 58. Adicionalmente, a presença de lactonoidrolases (lactonases), enzimas que catalisam a hidrólise reversível de lactonas a hidroxiácidos, já foi relatada em microorganismos, incluindo fitopatógenos (SHIMIZU, *et al.*, 1992; KATAOKA *et al.*, 2000; HONDA, *et al.*, 2002).

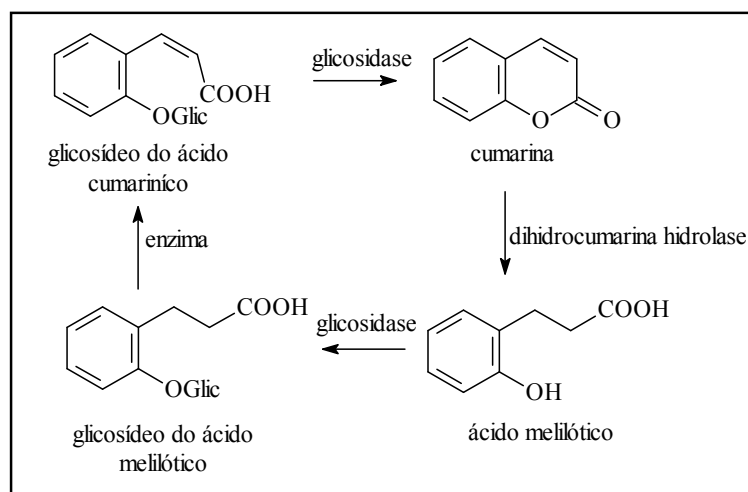
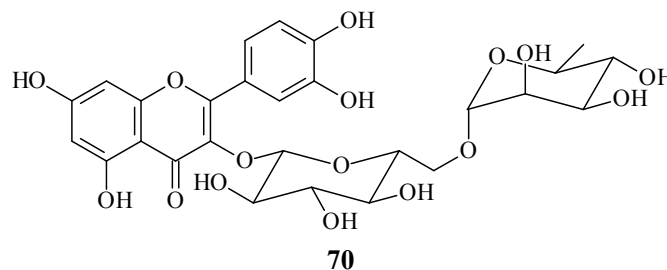


Figura 58. Seqüência de reações enzimáticas propostas para a conversão de cumarina em ácido melilótico. Adaptado de STOKER; BELLIS, 1962; KOSUGE; CONN, 1962.

Após a colheita e durante os processos de secagem e processamento de drogas vegetais ocorre a destruição de compartimentos celulares, que pode resultar em degradação de constituintes bioativos, devido a atividade enzimática da droga (BAUMGERTEL *et al.*, 2003). Esses autores isolaram uma glicosidase de partes aéreas secas de *Fagopyrum esculentum* Moench, responsável pela conversão de rutina (70) em quercetina (66) e mostraram que a degradação enzimática de compostos biologicamente ativos pode ocorrer em vários estágios dos processos farmacêuticos.



Quanto aos diterpenos caurânicos não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) para seus teores em *M. laevigata* durante o período de armazenamento, com exceção da concentração de ácido benzoilgrandiflórico oriunda de plantas cultivadas sob 80% de sombreamento (Figura 57). No entanto, os perfis cromatográficos obtidos indicam alterações nos picos dos diterpenos caurânicos, a partir do terceiro mês (Figura 55). A análise da pureza espectral desses picos acusou impurezas a partir do sexto mês e perda significativa da resolução entre os picos correspondentes aos ácidos cinamoilgrandiflórico e caurenóico, especialmente no nono mês (Tabela 51).

Tabela 51. Valores de resolução cromatográfica entre os picos dos ácidos cinamoilgrandiflórico e caurenóico em *M. laevigata*, durante o armazenamento da droga vegetal.

	T ₀	T ₃	T ₆	T ₉	T ₁₂	T ₁₅	T ₁₈
PS	2,63	1,89	1,57	0,93	1,36	1,35	1,82
40%	2,62	1,81	1,52	0,92	1,35	1,26	1,84
80%	2,61	1,56	1,41	0,93	1,29	1,19	1,65

Legenda: **Legenda:** T₀, tempo inicial do estudo; T₃, 3 meses; T₆, 6 meses; T₉, 9 meses; T₁₂, 12 meses; T₁₅, 15 meses e T₁₈, 18 meses de armazenamento. **PS:** pleno sol; **40%** e **80%** de sombreamento.

Resultados semelhantes foram observados para os diterpenos caurânicos nas amostras analisadas de *M. glomerata*. Conforme evidenciado pela Figura 54, a diminuição nos teores dos diterpenos caurânicos ocorreu a partir do terceiro mês, acompanhada de perda de resolução entre os picos dos ácidos cinamoilgrandiflórico e caurenóico no nono mês de análise, bem como a formação de produtos de decomposição, verificados pelos perfis cromatográficos e análises de pureza de picos (Tabela 52, Figura 59).

Tabela 52. Valores de resolução cromatográfica entre os picos dos ácidos cinamoilgrandiflórico e caurenóico em *M. glomerata*, durante o armazenamento da droga vegetal.

	T ₀	T ₃	T ₆	T ₉	T ₁₂
PS	1,99	1,45	1,32	nd	1,20
40%	2,01	1,33	1,26	nd	1,14
80%	1,98	1,23	1,15	nd	1,07

Legenda: **Legenda:** T₀, tempo inicial do estudo; T₃, 3 meses; T₆, 6 meses; T₉, 9 meses; T₁₂, 12 meses; T₁₅, 15 meses e T₁₈, 18 meses de armazenamento. **PS:** pleno sol; **40%** e **80%** de sombreamento. **nd:** resolução não determinada devido alargamento das bandas.

Os espectros no ultravioleta registrados na base ascendente e descendente do pico do ácido benzoilgrandiflórico em *M. glomerata* evidenciaram transformações químicas durante a estocagem, já no terceiro mês de análise (Figura 59). Um comportamento semelhante foi observado para o pico correspondente ao ácido caurenóico em *M. glomerata*.

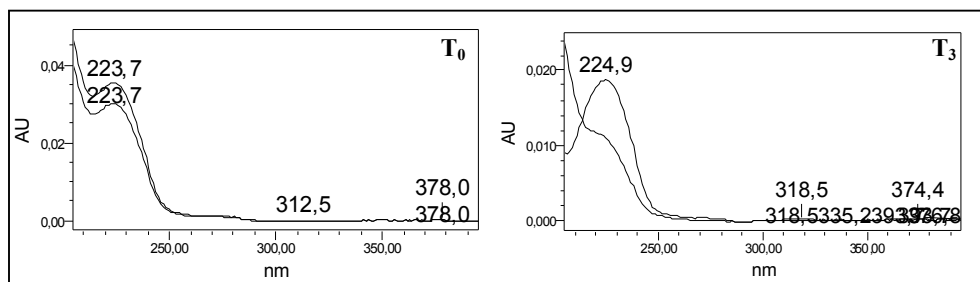


Figura 59. Espectros no ultravioleta registrados *on-line* pelo detector de DAD na porção ascendente e descendente do pico do ácido benzoilgrandiflórico nos cromatogramas da Figura 55. **Legenda:** T₀, tempo inicial do estudo; T₃, 3 meses.

Os teores dos diterpenos caurânicos em *M. glomerata* cultivada a pleno sol não apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) (Figura 60). No entanto, diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas para amostras provenientes do cultivo sob 40% e 80% de sombreamento, com exceção do ácido cinamoilgrandiflórico na última condição de cultivo (Figura 60).

A perda de resolução dos picos correspondentes aos diterpenos caurânicos, a diminuição significativa de seus teores em algumas amostras e a ausência de pureza espectral sugerem a ocorrência de transformações químicas desses compostos.

Vale ressaltar que a perda de resolução observada para os diterpenos caurânicos não resultou da perda de eficiência da coluna, pois amostras não submetidas ao armazenamento apresentaram resolução similar àquela obtida no tempo inicial do estudo (T₀).

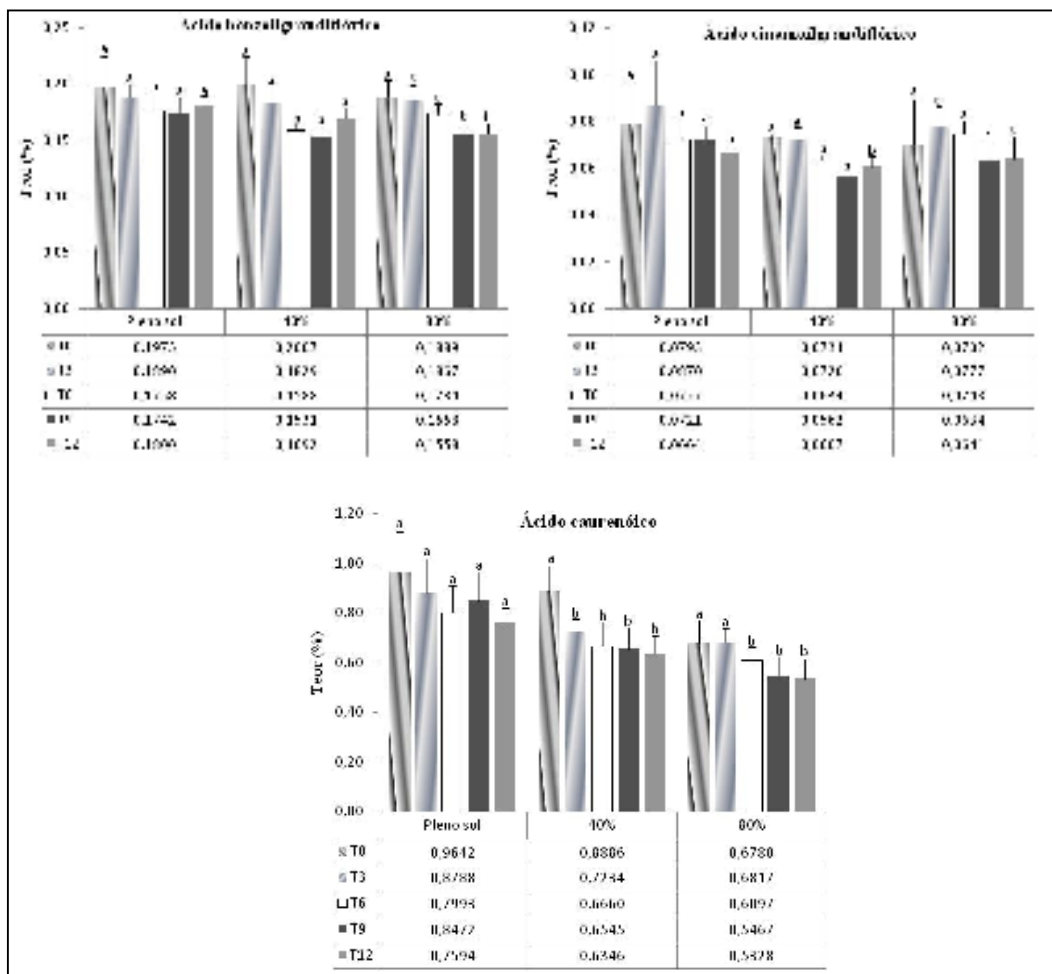


Figura 60. Teores médios (%) dos marcadores químicos em folhas de *M. glomerata* cultivadas sob diferentes níveis de sombreamento e armazenadas para avaliação de estabilidade de marcadores químicos. **Legenda:** T₀, tempo inicial do estudo; T₃, 3 meses; T₆, 6 meses; T₉, 9 meses e T₁₂, 12 meses de armazenamento. As médias seguidas de mesma letra nos diferentes níveis de sombreamento, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$) ($n = 6$).

Variações nos teores de diterpenos *ent*-labdenos em folhas pulverizadas de *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees foram relatadas para droga vegetal armazenada à temperatura ambiente por períodos de 0, 3, 6, 11, 12 e 15 meses. O teor de andrografolídeo (65) diminuiu nos três primeiros meses mantendo-se constante até 15 meses. Por outro lado, o teor de 14-desóxi-11,12-didesidroandrografolídeo (63) aumentou com o tempo de estocagem, após ligeira redução no início do terceiro mês (PHOLPHANA *et al.*, 2004). As estruturas químicas de 65 e 63 estão apresentadas no item 3.4.

O presente estudo demonstrou que a integridade química dos diterpenos caurânicos (ácidos benzoilgrandiflórico, cinamoilgrandiflórico e caurenóico) presentes nas drogas

vegetais *M. glomerata* e *M. laevigata* é afetada a partir do terceiro mês de armazenamento. A cumarina, presente apenas na segunda droga vegetal, é afetada a partir do sexto mês de armazenamento. O teor mínimo de cumarina preconizado pela Farmacopéia Brasileira IV para a droga vegetal *M. laevigata* é de 0,1%, mas não há na literatura recomendações para teores de diterpenos em guacos (F.Bras.IV, 2005). Os teores de cumarina quantificados nas amostras de *M. laevigata*, durante os 18 meses de armazenamento da droga vegetal, com exceção da maioria das amostras provenientes do cultivo sob 80% de sombreamento, variaram de 0,10% a 0,16% e estas seriam, portanto, aprovadas em procedimentos de controle de qualidade (Figura 57). Mas deve-se levar em conta que os teores determinados nesse experimento tem sua exatidão comprometida devido a perda de especificidade do método cromatográfico em amostras armazenadas por períodos superiores a 3 meses, conforme já discutido. A perda de especificidade do método, nessas condições, impossibilitou avaliar o percentual de redução do teor de cumarina e de diterpenos caurânicos nas drogas vegetais armazenadas ao longo do período do estudo.

Diante desses resultados, propõe-se que estudos de atividade biológica sejam realizados com drogas vegetais armazenadas, a fim de verificar se as alterações químicas observadas implicariam em variações dos efeitos farmacológicos.

6 CONCLUSÕES

- Os perfis cromatográficos das espécies de guaco trabalhadas (*M. laevigata* e *M. glomerata*) apresentaram diferenças marcantes, com presença dos derivados caurânicos [ácidos benzoilgrandiflórico (**39**), cinamoilgrandiflórico (**4**) e caurenóico (**2**)] em ambas as espécies e a ausência dos derivados cinâmicos [cumarina (**33**) e ácido *o*-cumárico (**42**)] na segunda espécie.
- O método cromatográfico desenvolvido para análise das drogas vegetais *M. laevigata* e *M. glomerata* apresentou linearidade, precisão, exatidão, robustez e seletividade adequadas para quantificação simultânea de cinco marcadores químicos **33**, **42**, **39**, **4** e **2**.
- O teor de **33** ($0,94 \pm 0,24$ %) é incrementado nas plantas cultivadas no verão e sob 80% de sombreamento.
- *M. laevigata* necessita de cultivo protegido sob 80% de sombreamento para a maximização dos teores de **33**, à custa da diminuição do teor de diterpenos caurânicos, sendo a colheita realizada, preferencialmente, no verão.
- *M. glomerata* deve ser cultivada sob radiação solar plena e suas folhas coletadas no inverno para obtenção de material vegetal com maiores teores de diterpenos caurânicos (**39**, **4** e **2**).
- Considerando os resultados obtidos no que tange a prática agrônômica, para o incremento dos teores de **33** e redução de custo de produção, recomenda-se o cultivo consorciado de *M. laevigata* com espécies arbóreas, e sua colheita realizada nas estações inverno e verão.
- A estabilidade química dos diterpenos caurânicos (**39**, **4** e **2**) presentes nas drogas vegetais *M. glomerata* e *M. laevigata* é afetada a partir do terceiro mês de armazenamento e da **33**, presente apenas em *M. laevigata*, é afetada a partir do sexto mês de armazenamento.
- A detecção de interferentes nos picos correspondentes aos marcadores químicos (**33**, **39**, **4** e **2**) implicou em perda de seletividade do método cromatográfico, o que comprometeu as análises quantitativas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOY, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; LANGELOH, A.; BASAN, V.L. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas de *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae), guaco. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36, n. 1, jan./jun. 2000.

ABREU, I.N.; MAZZAFERA, P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 241-48, 2005.

AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAI, T. Spectral quality and UV-B stress stimulate glycyrrhizin concentration of *Glycyrrhiza uralensis* in hydroponic and pot system. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 1074-81, 2005.

AGUINALDO, A. M.; PADOLINA, W.G.; YAMAUCHI, T. Flavonoids from *Mikania cordata*, **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 665-668, 2003.

ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; PIRES, A.M.L.; PESSOA, O.D.L.; SILVEIRA, E.L. Terpenoids, flavonoids and other constituents of *Eupatorium betonicaeforme* (Asteraceae). **Journal Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 17, n. 1, 2006 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532006000100010&lng=&nrm=iso>. Acesso em: 03 nov. 2008.

ALVARENGA, A.A.; CASTRO, E.M.; LIMA JUNIOR, É.C.; MAGALHÃES, M.M.. Effects of different light levels on the initial growth and photosynthesis of *Croton urucurana* Baill. in southeastern Brazil. **Revista Árvore**, v.27, n. 1, p.53-57, Jan./Feb. 2003.

AMBROSIO, S.R.; TIRAPELLI, C.R.; COSTA, F. B.; OLIVEIRA, A.M. Kaurane and pimarane-type diterpenes from *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. **Life Sciences**, v. 79, p. 925-933, 2006.

AMBROZIN, A.R.P.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; ALBUQUERQUE, S. Piranoflavonas inéditas e atividades tripanocidas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*. **Química Nova**, v. 31, n. 4, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000400005&lng=&nrm=iso>. Acesso em: 03 nov. 2008.

ANTONACIO, C.C.; WISINIEWSKI, C. Caracterização ecológica e fitoquímica de *Mikania laevigata* Schultz ex Baker no primeiro planalto paranaense. XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Águas de Lindóia, São Paulo, **Resumo** 02.019, p.105, 1998.

BASER, K.H.C.; BONDI, M.L.; BRUNO, M.; KIRIMER, N.; PIOZZI, F.; TUMEN, G.; VASSALLO, N. An *ent*-kaurane from *Sideritis Huber-morathii*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1293-1295, 1996.

BATISTA, R. **Quantificação de diterpenos caurânicos em *Wedelia paludosa* D.C. e síntese de diterpenil-naftoquinonas, glicosídeos e outros derivados caurânicos a partir dos ácidos caurenóico, *iso*-caurenóico e grandiflorênico**. 2005. 361 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, 2005.

BATISTA, R.; BRAGA, F.C.; OLIVEIRA, A. B. Quantitative determination by HPLC of *ent*-kaurenoic and grandiflorenic acids in aerial parts of *Wedelia paludosa* D.C. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 2, p. 119-125, 2005.

BAUMGERTEL, A.; GRIMM, R.; EISENBEIB, W.; KREIS, W. Purification and characterization of a flavonol 3-*O*- β -heterodisaccharidase from the dried herb of *Fagopyrum esculentum* Moench. **Phytochemistry**, v. 64, p. 411-418, 2003.

BENGOECHEA, L.; HERNÁNDEZ, T.; QUESADA, C.; BARTOLOMÉ, B.; ESTRELLA, I.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Structure of hydroxycinnamic acid derivatives established by High-Performe Liquid Chromatography with Photodiode-Array Detection. **Chromatographia**, v. 41, n. 1/2, Jul 1995, p. 94-98.

BERTOLUCCI, S.K.V; PEREIRA, A.B.D.; PINTO, J.E.B.P.; RIBEIRO, J.A.A.; OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C. Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of cinnamic acid derivatives and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Planta Medica**, v. 75, p. 1-6, 2009.

BIAVATTI, M.W.; HOERICH, C. A.; HENCK, C.H; ZUCATELLI, E.; MARTINELI, F.H.; BRESOLIN, T.B.; LEITE, S.N. Coumarin content and physicochemical profile of *Mikania laevigata* extracts. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 59, n. 3-4, p. 197-200, 2004.

BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A.; KOHN, L.K.; REHDER, V.L.G.; FOGLIO, M.A.; POSSENTI, A.; VILELA, L.; CARVALHO, J.E. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, v. 12, p. 72-77, 2005.

BJÖRKAMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O.; NOBEL, P.S.; OSMONA, C.B.; ZIEGLER, H. (eds.). **Physiological plant ecology I. responses to the physical environment**. Encyclopedia od Plant Physiology, New York: Springer-Verlag, 1981.57-60, 652p.

BOHLMANN, F.; ADLER, A.; JAKUPOVIC, J.; KING, R.M.; ROBINSON, H. A dimeric germacranolide and other sesquiterpene lactones from *Mikania* species. **Phytochemistry**, v. 21, n. 6, p. 1349-1355, 1982b.

BOHLMANN, F.; ADLER, A.; SHUSTER, A.; GUPTA, R. K.; KING, R. M.; ROBINSON, H.; Diterpenes from *Mikania* species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 1899-1902, 1981.

BOHLMANN, F.; SINGH, P.; JAKUPOVIC, J.; ROBINSON, H. A.; KING, R.M. An epoxygermacranolide and further constituents from *Mikania* species. **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 705-707, 1982a.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 5, de 11 de dezembro de 2008. Determina a publicação da "LISTA DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS DE REGISTRO SIMPLIFICADO". *Diário Oficial da União*, Brasília, 12 dez 2008. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=34477&word=normativa>>. Acesso em: 2 fev 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 18 mar 2004. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230&word=>>. Acesso em: 09 mar 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 31 mai 2003. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>> Acesso em: 09 mar 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 148 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL, Presidência da República, Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006a. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, 22 jun 2006. Disponível em: < https://www.planalto.gov.br/ccivil/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm> Acesso em: 12 mar 2007.

BRENZAN, M.A.; FRANCO, S.L. Contribuição aos conhecimentos da farmacologia, química, farmacotécnica, controle de qualidade, dos aspectos agrônômicos e da toxicidade do guaco (*Mikania glomerata* Sprengel). **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 5, n. 4, p. 230-42, 2007.

BRESCIANI, L.F.V., YUNES, R. A.; BURGER, C.; OLIVEIRA, L. E.; BOF, K.L.; CECHINEL, V. Seasonal variation of kaurenoic acid, a hypoglycemic diterpene present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). **Zeitschrift fur Naturforschung C – A Journal of Biosciences**, v. 59, n. 3-4, p. 229-232, mar-abr 2004.

BROWN JÚNIOR, K. S. Engenharia ecológica: perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. **Acta Amozônica**, v.18, n.1-2, p. 291-303, 1988.

BRUNETON, J. Coumarins. In: **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**.2. ed., France: Lavoisier, 1995. pt. 2, p. 229-240.

CABRAL, L.M.; SANTOS, T.C.; ALHAIQUE, F. Development of a profitable procedure for the extraction of 2-H-1-benzopyran-2-one (coumarin) from *Mikania glomerata*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 103-106, 2001.

CAMPOS-BEDOLLA, P; CAMPOS, M.G.; VALENCIA-SÁNCHEZ, A.; PONCE-MONTER, H.; URIBE, C.; OSUNA, L.; CALDERÓN, J. Effect of kauranes from *Montanoa* spp. on rat uterus. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 11-16, 1997.

CARDELLINA, J.H. Challenges and opportunities confronting the botanical dietary supplement industry. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1073-1084, 2002.

CARVALHO, M.G.; VELANDIA, J.R.; OLIVEIRA, L.F.; BEZERRA, F.B. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 740-743, 1998.

CASTRO, A.H.F.; YOUNG, M.C.M.; ALVARENGA, A.A.; ALVES, J.D. Influence of photoperiod on the accumulation of allantoin in comfrey plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.1, p. 49-54, 2001.

CASTRO, E.M.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; MALTA, M.R.; CARDOSO, M.G.; SILVA, F.A.M. Coumarin contents in young *Mikania glomerata* plants (guaco) under different radiation level and photoperiod. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 387-92, 2006.

CASTRO, V.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F. Germacranolides from *Mikania* species. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 527-530, 1989.

CELEGHINI, R.M.S.; VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M. Análise quantitativa de cumarina em amostras comerciais de “guaco” por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 1, n. 2, p. 23-28, 1999.

CELEGHINI, R.M.S.; VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hidroalcoholic extratcts of *Mikania glomerata* Spreng. (“ guaco”) leaves. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 6, p. 706-709, 2001.

CHAGAS, J.H. **Crescimento e rendimento de óleo essencial de *Artemisia camphorata* Vill. sob três níveis de radiação**. 2005, 41p. Monografia (Bacharel em Engenharia Agrônômica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CORRÊA, R.M. **Adubação orgânica, intensidade e qualidade de luz no crescimento de plantas, características anatômicas e composição química do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.)**. 2008. 131 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

COSTA, C.C.; CASALI, V.W.D.; MACEDO, J.A.B. Qualidade de folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) após secagem e embalagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.1, n.2, p.1-5, 1999.

CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F. Diterpene acids from *Mikania triangularis*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 8, p. 2793-2796, 1992.

CUNHA, K.M.A.; PAIVA, L.A.F.; SANTOS, F.A.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus *in vitro*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 4, p. 320-324, 2001.

DIXON, R.A.; PAIVA, N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, p. 1085-97, 1995.

DOMÍNGUEZ, M.; MARÍN, J.C.; ESQUIVEL, B.; CÉSPEDES, C.L. Pensteminoside, an unusual catalpol-type iridoid from *Penstemon gentianoides* HBK (Plantaginaceae). **Phytochemistry**, v. 68, p. 1762-1766, 2007.

DONG, M.; PAUL, R.; GERSHANOV, L. Getting the peaks perfect: System suitability for HPLC. **Today's chemist at work [on-line]**. v. 10, n. 09, pp 38-40, 42, sep 2001. Disponível em: <http://pubs.acs.org/subscribe/journals/tcaw/10/i09/html/09dong.html>. Acesso em: 02 mar. 2007.

DRASAR, P.; MORAVCOVA, J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 3-21, 2004.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M.R.; DEBUR, M.C. Stem and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 41-49, 2005.

DUTRA, B. A. Validação da metodologia analítica de quantificação da cumarina (1,2-benzopirona) nas folhas de *Mikania glomerata* Sprengel, por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Monografia** (Bacharelado em Farmácia), Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário Newton Paiva. Belo Horizonte, 58 p., 2005.

DYER, J.R. **Aplicações da espectroscopia de absorção aos compostos orgânicos**. E. Blucher, São Paulo: 1969, reimpr.1977. 155p.

EDREVA, A. The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 106, p. 135-146, 2005.

FABBRI, H.; OLIVEIRA, D. C. R.; VICHNEWSKI, W.; HERZ, W. Diterpenes of *Mikania lindbergii* Baker. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 6, p. 563-564, 1997.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA I. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1929.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. pt 2. Sexto fascículo. São Paulo: Atheneu, 2005, p.292.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for industry: analytical procedures and methods validation. 2000. <<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>> Acesso em: 11 nov 2008.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for industry: botanical drug products. 2004. < <http://www.fda.gov/cder/guidance/4592fnl.htm> > Acesso em: 18 out 2008.

FENNELL, C.W.; LIGHT, M.E.; SPARG, S.G.; STAFFORD, G.I.; STADEN, J. V. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 113-121, 2004.

FERREIRA, D.F. **SISVAR 5.0**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA/DEX, 2007, *Software*.

FIERRO, I.M.; SILVA, A.C.B.; LOPES, C.S.; MOURA, R.S.; BARJA-FIDALGO, C. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 19-24, 1999.

FIGUEIRA, G.M.; MONTANARI JUNIOR, I.; MAGALHÃES, P.M.; PEREIRA, B.; ARCHÂNGELO JUNIOR, U. Técnicas de cultivo de guaco (*Mikania glomerata* Spreng.). **Horticultura Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 37, 1991.

FORGO, P.; KÖVÉR, K.E. Gradient enhanced selective experiments in the ¹H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. **Steroids**, v. 69, p. 43-50, 2004.

FRANCHI, S.M.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M. New isolated constituents from *Mikania glomerata* Sprengel, Asteraceae. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, 2000, Recife PE. Resumos ... do Brasil, Centro de Convenções da Universidade Federal de Pernambuco, 2000. p. 145.

FREITAS, A. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**. Brasília: Ministério da Saúde - Área de Economia da Saúde e Desenvolvimento, 2007. 15p.

GILANI, A. H.; RAHMAN, A. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 43-49, 2005.

GILBERT, B.; FERREIRA, J.L.P.; ALVES, L.F. **Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz/Far-Manguinhos. v. 1, p. 90-114, 2004.

GNOATTO, S. C.B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L.HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 723-726, 2005.

GONÇALVES, J.F.C.; BARRETO, D.C.S.; SANTOS JÚNIOR, U.M.; FERNANDES, A.V.; SAMPAIO, P.T.B.; BUCKERIDGE, M.S. Growth, photosynthesis and stress indicators in young rosewood plants (*Aniba rosaeodora* Ducke) under different light intensities. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 17, n. 3, p. 325-34, 2005.

GONZÁLEZ, A.G.; HERRADOR, M.A. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 227-238, 2007.

GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G.; LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. H.; CARVALHO, M. G.; BRAZ FILHO, R. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrógeno dos diterpenos jatrolonas A e B. **Química Nova**, v. 16, n. 2, p.95-100, 1993.

GRAÇA, C.; BAGGIO, C.H.; FREITAS C.S.; RATTMANN, Y.D.; SOUZA, L.M.; CIPRIANI, T.R.; SASSAKI, G.L.; RIECK, L.; PONTAROLO, R.; SILVA-SANTOS, J.E.; MARQUES, M.A. *In vivo* assessments of safety mechanism underlying *in vitro* relaxation induced by *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker in the rat trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 430-439, 2007a.

GRAÇA, C.; FREITAS C.S.; BAGGIO, C.H.; DALSENTER, P.R.; MARQUES, M.A. *Mikania laevigata* syrup does not induce side effects on reproductive system of male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 29-32, 2007b.

GRIGGS, J.K.; MANANDHAR, G.H.N.; TOWERS, G.H.N.; TAYLOR, R.S.L. The effects of storage on the biological activity of medicinal plants from Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 247-252, 2001.

HANAI, K.; KUWAE, A.; TAKAI, T.; SENDA, H.; KUNIMOTO, K. A comparative vibrational and NMR study of *cis*-cinnamic acid polymorphs and *trans*-cinnamic acid. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 57, p. 513-519, 2001.

HONDA, K.; KATAOKA, M.; SHIMIZU, S. Enzymatic preparation of D- β -acetylthioisobutyric acid and cetraxate hydrochloride using a stereo- and/or regioselective hydrolase, 3,4-dihydrocoumarin hydrolase from *Acinetobacter calcoaceticus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 288-292, 2002.

ICH, INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of analytical procedures: methodology (Q2B)**. Geneva: ICH Secretariat, 1996. p. 1-8.

KATAOKA, M.; HONDA, K.; SHIMIZU, S. 3,4-Dihydrocoumarin hydrolase with haloperoxidase activity from *Acinetobacter calcoaceticus* F46. **European Journal Biochemistry**, v. 267, p. 3-10, 2000.

KHAN, I. A. Issues related botanicals. **Life Sciences**, v. 78, p. 2033-2038, 2006.

KISLYUK, I.M.; BUBOLO, L.S.; PALEEVA, T.V.; SHERSTNEVA, O.A. Heat-induced increase in the tolerance of the wheat photosynthetic apparatus to combined action of high temperature and visible light: CO₂ fixation, photosynthetic pigments, and chloroplast ultrastructure. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, n. 4, p. 455-463, 2004.

KNUDSEN, F. S.; VILEGAS, W.; OLIVEIRA, F.; ROQUE, N. F. Pimaradiene diterpenes from *Mikania triangularis*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 5, p. 1240-1242, 1986.

KONGDUANG D.; WUNGSINTAWEEKUL J.; DE-EKNAMKUL, W. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 4067-4072, 2008.

KÖPPEN, W. **Climatología: con un estudio de los climas de la tierra**. Mexico: Fondo de Cultura Economica, 1948. 478p.

KOSUGE, T., AND CONN, E. E., J. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. I. Coumarin and o-coumaric acid. **The Journal Biological Chemistry**, v. 234, p. 2133-2137, 1959.

KOSUGE, T., AND CONN, E. E., J. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. V. purification and properties of dihydrocoumarin hydrolase of *Melilotus alba*. **The Journal Biological Chemistry**, v. 236, p.1653-1656, 1962.

KSOURI, R.; MEGDICHE, W.; FALLEH, H.; TRABELSI, N.; BOULAABA, M.; SMAOUI, A.; ABDELLY, C. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic

content and antioxidant activities of *Tunisian halophytes*. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 865-873, 2008.

KUPRIYANOVA, G.S. NMR studies of the electronic structure of coumarins. **Journal of Structural Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 408-414, 1997.

KUSTER, R.M.; ROCHA, L.M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis, Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. cap 21, p.551.

LANÇAS, F. M.; VILEGAS, J. H. Y.; VASCONCELOS, E. C.; CELEGUINI, R. M. S. Novas aplicações de sistemas SFE “home made”. I. plantas medicinais brasileiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 4, dez 1997.

LAZAROWYCH, N.J.; PEKOS, P. Use of fingerprinting and marker compounds for identification and standardization of botanical drugs: strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis to herbal products. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 497-512, 1998.

LEITE, M.G.R.; SOUZA, C.L.; SILVA, M.A.M.; MOREIRA, L.K.A.; MATOS, F.J.A. ; VIANA, G.S.B. Estudo farmacológico de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), *Justicia pectoralis* Jacq (anador) e *Torresea cearensis* Fr. All (cumarú). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 74, n. 1, p. 12-15, 1993.

LI, W.; DENG, Y.; DAÍ, R.; YU, Y.; SAEED, M.K.; LI, L.; MENG, W.; ZHANG, X. Chromatographic fingerprint analysis of *Cephalotaxus sinensis* from various sources by high-performance liquid chromatography–diodearray detection–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 45, p. 38-46, 2007.

LICHTENTHALER, H.K. Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, α -tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. **Photosynthesis Research**, v. 92, n. 2, p. 163-179, 2007.

LICHTENTHALER, H.K. The 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 47-65, 1999.

LIMA, N. P.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F.; NAKASHIMA, T. Estaquia semilenhosa e análise de metabólitos secundários de guaco *Mikania gloemerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 5, n. 2, p. 47-54, 2003a.

LIMA, N.P.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F.; NAKASHIMA, T. Produção de mudas por estaquia de duas espécies guaco. **Horticultura Brasileira**. v. 21, n. 1, 2003b.

LIU, R.; LI, A.; SUN, A. Preparative isolation and purification of hydroxyanthraquinones and cinnamic acid from the Chinese medicinal herb *Rheum officinale* Baill by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1052, p. 217-221, 2004.

LIU, Y.; WANG, M. Botanical drugs: challenges and opportunities contribution to Linnaeus Memorial Symposium 2007. **Life Sciences**, v. 82, p. 445-449, 2008.

LOBITZ, G. O.; TAMAYO-CASTILLO, G.; MERFORT, I. Diterpenes and sesquiterpenes from *Mikania banisteriae*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 1, p. 161-164, 1997.

LOBITZ, G. O.; TAMAYO-CASTILLO, G.; POVEDA, L.; MERFORT, I. Kaurene diterpenes from *Mikania vitifolia*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 805-809, 1998.

LOURENZANI, A.E.B.S.; LOURENZANI, W.L.; BATALHA, M.O. Barreiras e oportunidades na comercialização de plantas medicinais provenientes da agricultura familiar. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 34, n. 3, mar. 2004.

LUCAS, V. Estudo farmacognóstico do guaco. **Revista da Flora Medicinal**, v. 9, p. 101-132, 1942.

LUENGAS-CAICEDO, P.E. **Contribuição para a padronização de extratos de folhas de *Cecropia glaziovii* Snethl.: estudos de variação sazonal e intra-específica de flavonóides e proantocianidinas, de metodologias de extração e de atividade**. 2005. 267 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, 2005.

MACARI, P. A. T.; EMERECIANO, V. P.; FERREIRA, Z.M.G.S. Identificação dos triterpenos de *Miconia albicanstriana* através de análise por “micro computador”. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 260-264, 1990.

MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M.A.F. *et al.* Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 364-370, 2005.

MALMSTEN, T.; PÄÄKKÖNEN, K.; HYVÖNEN, L. Packaging and storage effects on microbiological quality of dried herbs. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 3, p. 873-75, 1991.

MANGETTI, A.L. **Os morangos dão mais lucro quando são produzidos sob Aluminet**. 2002. 2 p. Disponível em: < http://www.polysack.com/files/31625cb6fa_2831aeb6b9d5f6e07d9a9f.pdf>. Acesso em: 10 ago.2008.

MEDINA, C.; MACHADO, E. C. **Uma nova luz para o futuro dos pomares**. Campinas: IAC, 2006. 4 p. (Boletim Citrus). Disponível em: < <http://www.polysack.com/files/219e53b274618f7c2a7321150c2334f4.pdf>>. Acesso em: 10 ago.2008.

MELO, A. C.; COTA, B. B.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xylopi*a species. **Fitoterapia**, v. 72, p. 40-45, 2001.

MEYER, V. R. **Practical high-performance liquid chromatography**. 2. ed. New York: Wiley, 1996. p. 26.

MOURA, R.S.; COSTA, S.S.; JANSEN, J.M.; SILVA, C.A.; LOPES, C.S.; BERNARDO-FILHO, M.; NASCIMENTO DA SILVA, V.; CRIDDLE, D.N.; NUNES PORTELA, B.; RUBENICH, L.M.S.; ARAÚJO, R.G.; CARVALHO, L.C.R.M. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 249-56, Feb. 2002.

MYLES, D. C. Novel biologically active natural and unnatural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n.6, p 627-633, 2003.

NA, M; OH, W.K.; KIM, Y.H.; CAI, X.F.; KIM, S.; KIM, B.Y.; AHN, J.S. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by diterpenoids isolated from *Acanthopanax koreanum*. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 3061-3064, 2006.

NAITHANI, V.; NAIR, S.; KAKKAR, P. Decline in antioxidant capacity of Indian herbal teas during storage and its relation to phenolic content. **Food Research International**, v. 39, p. 176-181, 2006.

NAKAZAWA, T. A. Particularidades de formulações para fitoterápicos. **Revista Racine**, v. 53, nov/dez 1999, p. 38-41.

NASCIMENTO, A.M.; OLIVEIRA, D.C.R. Kaurane diterpenes and other chemical constituents from *Mikania stipulaceae* (M. Vahl) Willd. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 4, p. 552-555, 2001.

NEVES, L.J.; SÁ, M.F.A. Contribuição ao estudo das plantas medicinais *Mikania glomerata* Spreng. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 72, n. 2, p. 42-47, 1991.

NEW products and markets fuel growth in 2005. IMS *on-line* store, 3 de maio de 2006. Disponível em: < http://open.imshealth.com/webshop2/IMSinclude/i_article_20060503.asp>. Acesso em: 01 set.2006.

NGUYEN, A.; FONTAINE, J.; MALONNE, H.; CLAEYS, M.; LUHMER, M.; DUEZ, P. A sugar ester and an iridoid glycoside from *Scrophularia ningpoensis*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1186-1191, 2005.

NUNEZ, C.V.; AMÊNDOLA, M.C.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Diterpene acids from *Mikania* sp. nov (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 233-237, 2004.

OHKOSHI, E.; KAMO, S.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. *ent*-kaurenoic acids from *Mikania hirsutissima* (Compositae). **Phytochemistry**, v. 65, p. 885-890, 2004.

OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, M.A.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel e de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 20, n. 2, p.169-83, 1984.

OLIVEIRA, F.; OGA, S.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. Parâmetros físicos e químicos e efeito antiedema dos extratos fluidos de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e de guaco de mato (*Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker). **Anais de Farmácia e Química**, v. 25, n. 1-2, p. 50-54, 1985.

OLIVEIRA, F.; SAITO, M.L.; GARCIA, L.O. Morfologia externa das partes aéreas e anatomia foliar das espécies brasileiras de *Mikania* Willdnow seção *Globosae* Robinson – visão farmacognóstica. **Lecta**, v. 12, n. 1, p. 23-65, 1994.

ONG, E.S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 23–33, 2004.

OSÓRIO, A.C.; MARTINS, J.L.S. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 4, 2004.

PÄÄKKÖNEN K.; MALMSTEN, T.; HYVÖNEN, L. Drying, packaging, and storage effects on quality of basil, marjoram and wild marjoram. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 5, p. 1373-1377, 1990.

PÄÄKKÖNEN K.; MALMSTEN, T.; HYVÖNEN, L. Effects of drying method, packaging, and storage temperature and time on the quality of dill (*Anethum graveolens* L.). **Journal of Food Science**, v. 54, n. 6, p. 1485-1487, 1989.

PARENTI, A.; LONGHINI, R.; RAKSA, S.M.; NOVELLO, C.R.; FRANCO, S.L. Influência de métodos de secagem no teor de cumarinas do guaco (*Mikania glomerata* Spreng.). In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 5, 2001, Botucatu, SP. **Anais...** Botucatu. SP, UNESP, 2001, p. 8.

PAULA, V. F.; BARBOSA, L.C.A.; PILÓ-VELOSO, D.; DEMUNER, A.J.; HOWARTH, O. Constituintes químicos da casca de *Ochroma lagopus* swartz (Bombacaceae). **Eclética Química**. São Paulo, v. 23, 1998 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46701998000100004&lng=&nrm=iso>. Acesso em: 03 nov. 2008.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy**. 3. ed. Washington: Brooks/Cole. 2001. 579 p.

PEREIRA, A.M.S.; CÂMARA, F.L.A.; CELEGHINI, R.M.S.; VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M.; FRANÇA, S.C. Seasonal variation in coumarin content of *Mikania glomerata*. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2000.

PEREIRA, A.M.S.; MENEZES JÚNIOR, A.; CÂMARA, F.L.A.; FRANÇA, S.C. Influence of fertilizer on coumarin content and biomass production in *Mikania glomerata* Sprengel. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v. 6, n. 1, p. 29-36, 1998.

PHOLPHANA, N.; RANGKADILOK, N.; THONGNEST, S.; RUCHIRAWAT, S.; RUCHIRAWAT, M.; SATAYAVIVAD, J. Determination and variation of three active diterpenoids in *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees. **Phytochemical Analysis**, v. 15, p. 365-71, 2004.

PINTO, G.M.F.; PINTO, J.F.; JARDIM, I.C.S.F. **Extração com fluido supercrítico**, 2006. 22 p. Disponível em: <http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/ecfs_6/extras/ex_flu_sup_vf.pdf>. Acesso em: 07 ago.2008.

PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, J.C.W.C.; CASTRO, E.M. BERTOLUCCI, S.K.V.; MELO, L.A.; DOUSSEAU, S. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema do Brasil em função de níveis de sombreamento. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 2, p.210-204, 2007.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ed. Ministério da Agricultura: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984, v. 3, p. 518.

POLYSACK INDÚSTRIAS Ltda., s.d. Disponível em: < http://http://www.polysack.com/files/fc42f05f6_bab9497f30102_a306073755.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2008.

REHDER, V. L. G.; RODRÍGUES, M. V. N.; SARTORATTO, A.; SANTOS, A. S.; FIGUEIRA, G. M. Avaliação da composição química dos óleos essenciais de *Mikania laevigata* Schultz Bip e *Mikania glomerata* Sprengel. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, 2000a, Recife, PE, Brasil, **Anais...** do Brasil, Centro de Convenções da Universidade Federal de Pernambuco, 2000, p. 124-125.

REHDER, V.L.G.; RODRIGUES, M.V.N.; SARTORATTO, A.; SANTOS, A.S.; FIGUEIRA, G.M.; MONTANARI JUNIOR, I.; PEREIRA, B. Variação nos teores de cumarina em acessos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, 2000b, Recife, PE, Brasil. **Anais ...** do Brasil, Centro de Convenções da Universidade Federal de Pernambuco, 2000. p. 195.

REIS, A. A.; MENDES, C. C.; ROQUE, N. F.; RÊGO, J. L.; FERRAZ, T. P. L. Diterpenos da resina de *Mikania hookeriana* DC (Asteraceae). In: REUNIÃO ANUAL DA

SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23, 2000, Poços de Caldas, MG, Brasil, Livro de Resumos.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; *et al.* (org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis, Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. cap. 3, p.45-74.

RITTER, M. R.; BAPTISTA, L. R. M.; MATZENBACHER, N. I. Asteraceae. Gênero *Mikania* Willd. Secções *Globosae* e *Thyrsigerae*. Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul, n. 21. **Boletim do Instituto de Biociências**, UFRGS. Porto Alegre, n. 50, p. 1-90, 1992.

RITTER, M.R.; MIOTTO, S.T.S. Taxonomia de *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Hoehnea**, v. 32, n. 3, p. 309-359, 2005.

RITTER, M.R.; WAECHTER, J. L. Biogeografia do gênero *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 18, n. 3, p. 643-652, 2004.

RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M. G. Plantas medicinais e fitoterapia no SUS: a política do Ministério da Saúde. **Folha Medicinal on-line**. Informativo eletrônico do Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais, Rio de Janeiro, ano 1, n. 2, verão 2006. Disponível em: <<http://www.ibpm.org.br/principal.shtmL>>. Acesso em: 12 mar. 2007.

ROWBOTHAM, J.B.; SCHAEFER, T. Experimental and theoretical estimates of sigma and pi electron contributions to long-range spin-spin coupling constants in coumarin and its methyl derivatives. **Canadian Journal Chemistry**, v. 51, p. 953-960, 1972.

RÜNGELER, P.; BRECHT, V.; TAMAYO-CASTILLO, G.; MERFORT, I. Germacranolides from *Mikania guaco*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 475-489, 2001.

RUPPELT, B.M.; PEREIRA E.F.R.; GONÇALVES L.G.; PEREIRA A.N. Pharmacological screenig of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, supl. 2, p. 203-5, 1991.

SÁ, R.C.S.; LEITE, M.N.; PETERS, M. V.; GUERRA, M.O.; ALMEIDA, R.N. Absence of mutagenic effect of *Mikania glomerata* hidroalcoholic extract on adult Wistar rats *in vivo*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p. 599-604, jul 2006.

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

SANKAT, C.K.; MAHARAJ, V. Shelf life of the green herb 'shado beni' (*Eryngium foetidum* L.) stored under refrigerated conditions. **Postharvest Biology and Technology**, v. 7, p. 109-188, 1996.

SANTOS, P.A.; PEREIRA, A.M.S.; FRANÇA, S.C.; LOPES, N.P. Esteróides e cumarina em calos de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 35, n. 2, p. 231-35, 1999.

SANTOS, S.C.; KRUEGER, C.L.; STEIL, A.A.; KREUGER, M.R.; BIAVATTI, M.W.; WISNIEWSKI JUNIOR, A. LC characterisation of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. **Planta Medica**, v. 72, p. 679-684, 2006.

SANTOS, T.C.; TOMASSINI, T.C.B.; CABRAL, L.M. Estudos preliminares sobre a constituição química e atividade antimicrobiana de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, n. 3,4, p. 54-55, 1998.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; et al. (org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis, Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. cap. 15, p.371-400.

SCOTT, A.I. **Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products**. Oxford: Pergamon Press, 1964, p. 115-120.

SHARAPIN, N.; ROCHA, L; M.; CARVALHO, E. S.; ALBUQUERQUE LÚCIO, E. M. R.; SANTOS, E. V. M.; ALMEIDA, J. M. L. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. Santafé de Bogotá, D.C.: Convênio Andrés Bello (CAB) e Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento (CYTED), 2000, p.145-179.

SHI, Z.; HE, J.; ZHAO, M.; CHANG, W. Simultaneous determination of five marker constituents in traditional Chinese medicinal preparation Le-Mai granule by high liquid chromatography, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 469-473, 2005.

SHIMIZU, S., KATAOKA, M., SHIMIZU, K., HIRAKATA, M., SAKAMOTO, K.; YAMADA, H. Purification and characterization of a novel lactonohydrolase, catalyzing the hydrolysis of aldonate lactones and aromatic lactones, from *Fusarium oxysporum*. **European Journal Biochemistry**, 209, p. 383-390, 1992.

SILVA, A.M.S.; ALKORTA, I.; ELGUERO, J.; SILVA, V.L.M. A ¹³C NMR study the structure of four cinnamic acids and their methyl esters. **Journal of Molecular Structure**, v. 595, p. 1-6, 2001.

SILVA, F.; CASALI, V. W. D.; LIMA, R. R.; ANDRADE, N. J. Qualidade pós-colheita de *Achillea millefolium* L., *Origanum vulgare* L. e *Petroselinum crispum* (Miller) A. W. Hill em três embalagens. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 2, n. 1, p. 37-41, 1999.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 387 p.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 6 ed., Rio de Janeiro: Editora LTC, 2000. 460 p.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. 5. ed. Porto Alegre: Editora Universidade/UFRGS, p.88, 1998.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J. **Introduction to modern liquid chromatography**, 2. ed., John Wiley & Sons, New York, 765p., 1997.

SOARES, L.A.L.; OLIVEIRA, A.L.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 36, p. 787-790, 2004.

SONAGLIO, D.; SOUZA, S.M. Estudo da estabilidade de amostras de *Achyrocline satureoides* durante o armazenamento. **Caderno de Farmácia**. Porto Alegre, supl. 7, L.66-L68, 1991.

SOUZA, G.C.; CASTRO, E.M.; PINTO, J.E.B.P.; ALVES, E.; BIAGGIOTI, G.; DEUNER, S. Estrutura foliar e de cloroplastídeos de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker em diferentes condições de qualidade de luz. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 1, p. 78-80, 2007a.

SOUZA, M.F.; GOMES, P.A.; SOUZA JUNIOR, I.T.; FONSECA, M.M.; SIQUEIRA, C.S.; FIGUEIREDO, L.C.; MARTIN, E.R. Influência do sombreamento na produção de fitomassa e óleo essencial em alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 108-110, 2007b.

STAFFORD, G.I.; JÄGER, A.K.; STADEN, J.V. Effect of storage on the chemical composition and biological activity of several popular South African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 107-115, 2005.

STOKER, J.R.; BELIS, D.M. The biosynthesis of coumarin in *Melilotus alba*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 237, p. 2303-2305, 1962.

SUÁREZ, N. Ensaio de observação de comportamento da tela termo-refletora Aluminet 50% em tomate embaixo de estufas. 1999. Disponível em: <<http://www.polysack.com/files/ae870a41b9b2244cdbc5315499f6c7eb.pdf>>. Acesso em: 10 ago.2008.

SUYENAGA, E.S.; RECHE, E.; FARIAS, F.M.; SCHAPOVAL, E.E.; CHAVES, C.G.; HENRIQUES, A.T. Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 6, p.519-23, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p., 2004.

TALEB-CONTINI, S.H.; SANTOS, P.A.; VENEZIANI, R.C.S.; PEREIRA, A.M.S.; FRANÇA, S.C.; LOPES, N.P.; OLIVEIRA, D.C.R. Difference in secondary metabolites from leaf extracts of *Mikania glomerata* Sprengel obtained by micropropagation and cuttings. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 596-98, 2006.

TAN, X.; LI, Q.; CHEN, X.; WANG, Z.; SHI, Z.; BI, K.; JIA, Y. Simultaneous determination of 13 bioactive compounds in Herba Artemisiae Scopariae (Yin Chen) from different harvest seasons by HPLC–DAD. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 4-5, p. 847-53, 2008.

THE UNITED States pharmacopeia: USP29-NF24. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2006. Chromatography, p. 2644-2649; chap. <621>.

TIBERTI, L.A.; YARIWAKE, J.H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p. 378–384, 2007.

TIRAPELLI, C.R.; AMBROSIO, S.R.; COSTA, F.B.; OLIVEIRA, A.M. Inhibitory action of kaurenoic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenylephrine-induced rat carotid contraction. **Fitoterapia**, v. 73, p. 56-62, 2002.

VELANDIA, J.R.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R. Ácido *ent*-16 α ,17-diidroxicauran-19-óico isolado de *Ouratea semiserrata* e os desafios estereoquímicos dos carbonos quirais C-4 e C-16. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 397-404, 1998.

VENEZIANI, R.C.S.; OLIVEIRA, D.C.R. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 1, p. 99-102, 1999.

VICHNEWSKI, W.; LEITÃO FILHO, H.F.; MURARI, R.; HERZ, W. Cinnamoylgrandifloric acid from *Mikania oblongifolia*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 12, p. 2028-2029, 1977.

VILEGAS, J.H.Y., MARCHI, E.; LANÇAS, F. M. Determination of coumarin and kaurenoic acid in *Mikania glomerata* (guaco) leaves by capillary gas chromatography. **Phytochemistry Analysis**, Chichester, v. 8, p. 74-77, 1997a.

VILEGAS, J.H.Y., MARCHI, E.; LANÇAS, F.M. Extraction of low-polarity (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* ('guaco') leaves. **Phytochemistry Analysis**, v. 8, p. 266-270, 1997b.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E.M. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer Verlag, 1984. 320 p.

WEI, X.; HUANG, H.; WU, P.; CAO, H.; YE, W. Phenolic constituents from *Mikania micrantha*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 1091-1096, 2004.

WEN, D.; LI, C.; DI, H.; LIAO, Y.; LIU, H. A universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compounds herbal medicines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6624-29, 2005.

WHO. World Health Organization. **Traditional Medicine Strategy 2002-2005**. Geneva: World Health Organization, 2002. 74 p.

WITZELL, J.; GREF, R.; NÄSHOLM, T. Plant-part and temporal variation in phenolic compounds of boreal bilberry (*Vaccinium myrtillus*) plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 115-127, 2003.

XIE, Y.; JIANG, Z.; ZHOU, H.; CAI, X.; WONG, Y.; LIU, Z.; BIAN, Z.; XU, H.; LIU, L. Combinative method using HPLC quantitative and qualitative analyses for quality consistency assessment of a herbal medicinal preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 204-212, 2007.

YAN, R.; LI, S.; CHUNG, H.; TAM, Y.; LIN, G. Simultaneous quantification of 12 bioactive components of *Ligusticum chuanxiong* Hort. By high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 87-95, 2005.

YANG, L.; WU, D.; TANG, X.; PENG, W.; WANG, X.; MA, Y.; SU, W. Fingerprint quality control of Tianjihuang by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1070, p. 35-42, 2005.

YATSUDA, R.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A. *et al.* Effects of *Mikania* genus on growth and cell adherence of *Mutans streptococci*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 183-189, 2005.

ZAUPA, C.; CARRASCHI, L.; SILVA, E. A.; CHANKE, A. L. S. Controle de qualidade farmacobotânico e legal de fitoterápicos comercializados nas farmácias de Maringá (PR). **Revista Racine**, v. 58, p. 32-37, set./out. 2000.

ZAVALA, J.A.; RAVETRA, D.A. Allocation of photoassimilates to biomass, resin and carbohydrates in *Grindelia chiloensis* as affected by light intensity. **Field Crops Research**, v. 69, p. 143-49, 2001.

ZHAO, Y.; CHEN, B.; YAO, S. Simultaneous determination of abietane-type diterpenes, flavonolignans and phenolic compounds in compound preparations of *Silybum marianum* and

Salvia miltiorrhiza by HPLC-DAD-ESI MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 564-570, 2005.

ZHOU, .L.; KANG, J.; FAN, L.; MA, X.; ZHAO, H.; HAN, J.; WANG, B.; GUO D. Simultaneous analysis of coumarins and secoiridoids in Cortex Fraxini by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 39-46, 2008.